

Nachweis der Proteasegene von *Prevotella intermedia* in subgingivaler Plaque

Dissertation
zur Erlangung des
akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae
(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem
Rat der Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Stefan Hermann
geboren am 02.07.85 in Sonneberg

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Wolfgang Pfister, Jena
2. Priv. Doz. Dr. med. dent. Arndt Güntsch, Jena
3. Priv. Doz. Dr. med. dent. Sigrun Eick, Bern

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.09.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
SI-Einheiten	VII
1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung	3
2.1 Parodontitis	3
2.2 Epidemiologie der Parodontitis	3
2.3 Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis.....	4
2.4 Klinische Formen der Parodontitis.....	5
2.5 Parodontopathogene Mikroorganismen.....	7
2.5.1 Aggregatibacter actinomycetemcomitans.....	8
2.5.2 Porphyromonas gingivalis	9
2.5.3 Tannerella forsythia	10
2.5.4 Treponema denticola.....	11
2.5.5 Prevotella intermedia.....	12
3. Zielstellung	17
4. Materialien und Methoden	18
4.1 Patientenproben	18
4.2 DNA-Extraktion.....	19
4.3 Polymerase-Chain-Reaction.....	20
4.3.1 Material.....	20
4.3.2 Durchführung.....	21
4.3.3 Gelelektrophorese	23
4.4 Western Blot.....	26
4.4.1 Dot Blot.....	26
4.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
4.5 Aktivitätsbestimmung.....	31
5. Ergebnisse	35
5.1 Demographische Daten / Patientenpool	35
5.2 Mikrobiologische Ergebnisse nach PCR-Verfahren.....	36
5.3 Western Blot – Nachweis der Interpaine im Gingivafluid	40

5.4	Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung.....	41
6.	Diskussion	47
6.1	Prävalenz im gingivalen Sulkus / Gennachweis Cysteinproteasen	47
6.2	Western Blot – Nachweis der Interpaine im Gingivafluid	49
6.3	Aktivitätsbestimmung – Nachweis der Proteaseaktivität.....	50
7.	Schlussfolgerung	57
	Literaturverzeichnis.....	58
	Lebenslauf	66
	Danksagung.....	67
	Ehrenwörtliche Erklärung	68

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Gingivitis- und Parodontitisprävalenz in verschiedenen Altersgruppen	4
Abbildung 2:	Probensammlung und Probenverwertung	18
Abbildung 3:	Verlaufsprotokoll Thermocycler	23
Abbildung 4:	Elektrophoresegel <i>P. intermedia</i> - Stamm- DNA	24
Abbildung 5:	Fluoreszenzmessung Real-time PCR <i>P. intermedia</i>	25
Abbildung 6:	Schmelzkurve <i>P. intermedia</i> (charakteristischer Schmelzpunkt bei 87°C).....	25
Abbildung 7:	Ergebnis nach Dot Blot.....	27
Abbildung 8:	Antigen-Antikörper-Reaktion	30
Abbildung 9:	<i>Prevotella intermedia</i> in Kultur.....	32
Abbildung 10:	Versuchsablauf Aktivitätsbestimmung	34
Abbildung 11:	Einteilung der 154 Patienten in 98 chronische, 41 aggressive Parodontitis und 15 Gesunde einschließlich der <i>Prevotella intermedia</i> -positiven Proben.....	36
Abbildung 12:	Prävalenz von <i>P. intermedia</i> bei chronischer Parodontitis (CP), aggressiver Parodontitis (AP) und gesundem Parodont.....	37
Abbildung 13:	Nachweis der Proteasegene von Interpain A, Interpain B und Interpain C ausgehend von der Gesamtzahl von den auf <i>P. intermedia</i> -Stamm-DNA getesteten Positivproben chronischer und aggressiver Parodontitis	38
Abbildung 14:	Prozentuale Darstellung der einzelnen Proteasegennachweise für Interpain A, B und C in Proben chronischer und aggressiver Parodontitis.....	40
Abbildung 15:	Elektrophoresegel nach Sichtbarmachen der zu detektierenden Gene mittels Fluoreszenzfarbstoff; Nachweis von Interpain B aus den <i>P. intermedia</i> -positiven Proben.....	40
Abbildung 16:	Western Blot zum Nachweis von Interpain A.....	41
Abbildung 17:	Darstellung der enzymatischen Aktivitäten im Sediment und im Überstand in Abhängigkeit vom zugeführten Substrat	42
Abbildung 18:	Serinproteasen-Aktivität im bakteriellen Sediment und im Überstand nach Zufuhr von FTC Casein zu den entsprechenden Kulturen	43
Abbildung 19:	Metallproteasen-Aktivität im bakteriellen Sediment des Stamms 13 nach Zufuhr von DQ Gelatin zu den entsprechenden Kulturen	44
Abbildung 20:	Cysteinproteasen-Aktivitäten im bakteriellen Sediment der Stämme BGH 3a, BGH 10, M13 und 120 vor und nach Inkubation mit dem Cysteinprotease-spezifischen Inhibitor E64	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht zu den verwendeten Primern zum qualitativen Bakteriennachweis mittels konventioneller PCR und quantitativem Bakteriennachweis mittels Real-time PCR für <i>Prevotella intermedia</i>	20
Tabelle 2:	Mastermixansatz: Beispiel für 12 Patientenproben	21
Tabelle 3:	Probenansatz: Beispiel für 6 Patientenproben	28
Tabelle 4:	Prävalenz von <i>P. intermedia</i>	37
Tabelle 5:	Nachweis der Proteasegene in <i>P. intermedia</i> -positiven Proben.....	38

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
<i>A. odontolyticus</i>	<i>Actinomyces odontolyticus</i>
Abb.	Abbildung
AK I/II	Antikörper I/II
AP	Aggressive Parodontitis
APS	Ammonium Persulfat
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
Boc-Val-Leu-Lys-AMC	t-Butyloxycarbonyl-L-valyl-L-leucyl-L-lysine-4-methylcoumaryl-7-amide
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>C. rectus</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
CP	Chronische Parodontitis
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DQ Gelatin	dye-quenched Gelatine
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. corrodens</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
<i>E. nodatum</i>	<i>Eubakterium nodatum</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E64	irreversibler Inhibitor von Cysteinproteasen
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
Fc-Fragment	Kurzbezeichnung für (französisch) fragment crystalline
FTC-Casein	fluorescein thiocarbamoyl casein
HCl	Chlorwasserstoff / Salzsäure
HRPeroxidase	horseradish peroxidase / Meerrettichperoxidase
IA / InpA	Interpain A
IB	Interpain B
IC	Interpain C
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin 1
iPiB-1/-2	Primerpaar Interpain B
iPiC-1/-2	Primerpaar Interpain C

KB-Zellen	maligne humane Epithelzellen
Kgp	Lysin-Gingipain
LMW-Marker	low molecular weight Marker
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Mg ²⁺ -Ionen	Magnesiumionen
MM	Mastermix
MMPs	Matrix Metalloproteinasen
Msp	Major surfaceproten
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i> / <i>Pi</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P. micra</i>	<i>Parvimonas micra</i>
PBS	phosphate buffered saline / phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PMNs	Polymorphonukleäre Neutrophile Granulozyten
pH	potentia hydrogenii / pH-Wert (Protonensättigung einer Lösung)
Pi-1/-2	Primerpaar <i>P. intermedia</i> Stamm-DNA
pos./POS	positiv
pPI-1/-2	Primerpaar Interpain A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RFU	relative fluorescence units
Rgp	Arginin-Gingipain
<i>S. constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate / Natriumlaurylsulfat
SRP	Scaling and root planing
<i>T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>T. forsythia</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
TTBS	Tris-Tween Buffered Saline
neg.	negative
UV-Transilluminator	Ultraviolett-Transilluminator
V. parvula	<i>Veillonella parvula</i>

SI-Einheiten

g	Erdbeschleunigung / Fallbeschleunigung
g	Gramm
kDa	Kilodalton
M	Mol
mg/l	Milligramm pro Liter
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
s / sek	Sekunde
U/min	Umdrehung pro Minute
V	Volt
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
°C	Grad Celsius
%	Prozent

1. Zusammenfassung

Die Parodontitis, die mittlerweile ohne Frage zu einer Volkskrankheit avanciert ist, stellt eine polymikrobielle Biofilminfektion dar.

Mikrobielle Grundlage ist die Kolonisation verschiedener Bakterienspezies, die in enger Interaktion miteinander agieren und durch Aktivierung des wirtseigenen Immunsystems und Produktion von verschiedenartig wirkenden Virulenzfaktoren den Abbau des knöchernen und ligamentösen Zahnhalteapparates forcieren.

Neben den als besonders parodontopathogen bekannten Bakterien *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans* wird auch das anaerobe, gramnegative Stäbchenbakterium *P. intermedia* im Zusammenhang mit parodontalen Erkrankungen gesehen.

P. intermedia produziert eine Reihe von Virulenzfaktoren, welche nicht nur das alveoläre Ligament zerstören, sondern auch durch verschiedene Mechanismen einen Weg gefunden haben, die wirtseigene Abwehr zu reduzieren. Dadurch schützt das Bakterium nicht nur sich selbst und andere im Biofilm vorhandene Bakterienspezies vor der Elimination durch die Abwehrzellen, sondern hat auch noch durch die proteolytische Spaltung die Fähigkeit Nährstoffe zur Verstoffwechselung bereit zu stellen.

Ziel der Studie war der Nachweis von *P. intermedia* und drei seiner Cysteinproteasen in subgingivalen Plaqueproben. Hierzu wurden Plaqueproben von insgesamt 154 Personen (41 aggressive Parodontitis (AP), 98 chronische Parodontitis (CP) und 15 parodontal gesund) zunächst auf das quantitative Vorkommen von *P. intermedia* untersucht. Weiterhin erfolgte mittels PCR-Verfahren der Nachweis der drei Proteasegene Interpain A, B und C. Abschließend wurde in einzelnen Proben von Sulkusflüssigkeit der Nachweis des Proteins von Interpain A mittels Western Blot versucht.

In 14 (34%) der Proben von AP und in 37 (38%) der Proben von CP konnte *P. intermedia* nachgewiesen werden, dabei wurde in 5 AP- und in 24 CP-Proben eine Keimzahl von $> 10^6$ detektiert. Keine der von parodontal gesunden Personen stammenden Proben enthielt *P. intermedia*. Interpain A wurde bei 41 (80%) der insgesamt 51 *P. intermedia*-positiven Proben gefunden, Interpain B wurde in 47 Fällen (92%) und Interpain C 48-mal (94%) nachgewiesen. Bei Interpain A und B wurden keine Unterschiede zwischen AP und CP festgestellt. Interpain C hingegen wurde in allen 37 *P. intermedia*-positiven CP-Proben nachgewiesen, jedoch ließ es sich nur in 11 der 14 AP-Proben detektieren (Chi-Quadrat-Test: $p=0,017$). Mittels Western Blot konnte Interpain A im gingivalen Sulkus nachgewiesen werden.

Die Expression der Gene für die Interpaine A, B und C konnte in beiden klinischen Verlaufsformen nachgewiesen werden.

Schlussfolgernd ist davon auszugehen, dass *P. intermedia* mit seinen Cysteineproteasen eine bedeutende Rolle bei Initiation und Progression der Parodontitis spielt.

2. Einleitung

2.1 Parodontitis

Die Parodontitis ist eine Erkrankung des Zahnhalteapparates bakteriellen Ursprunges, welche sowohl das Weichgewebe, als auch den umgebenen Knochen irreversibel schädigt. Der destruktive Knochenabbau führt zu Zahnlockerung und gipfelt im Zahnverlust.

2.2 Epidemiologie der Parodontitis

Etwa ab dem fünften Lebensjahrzehnt treten parodontale Probleme als Extraktionsursache in den Vordergrund.

Nach aktuellen Angaben gilt die Parodontitis für 30 bis 35% der Fälle als Ursache für den Zahnverlust (D. Heidemann 2005).

In der Bundesrepublik Deutschland liegen nur wenige relevante epidemiologische Studien vor. Jedoch lässt sich im Allgemeinen anhand der Ergebnisse in Abbildung 1 darauf schließen, dass bereits im Kindes- und Jugendalter eine hohe Parodontitisprävalenz zu verzeichnen ist, die mit zunehmendem Alter stetig steigt.

Laut der 4. Deutschen Mundgesundheitsstudie leiden unter den 15-jährigen Jugendlichen 12,6% an einer mittelschweren und 0,8% an einer schweren Parodontitis. Bei 52,7% der 35 bis 44-Jährigen sind mittelschwere und bei 20,5% schwere Parodontitiden zu verzeichnen. Bei den Senioren sind 48% von einer mittelschweren und 39,8% von einer schweren Ausprägung der Krankheit betroffen (DMS IV Kurzfassung 2006).

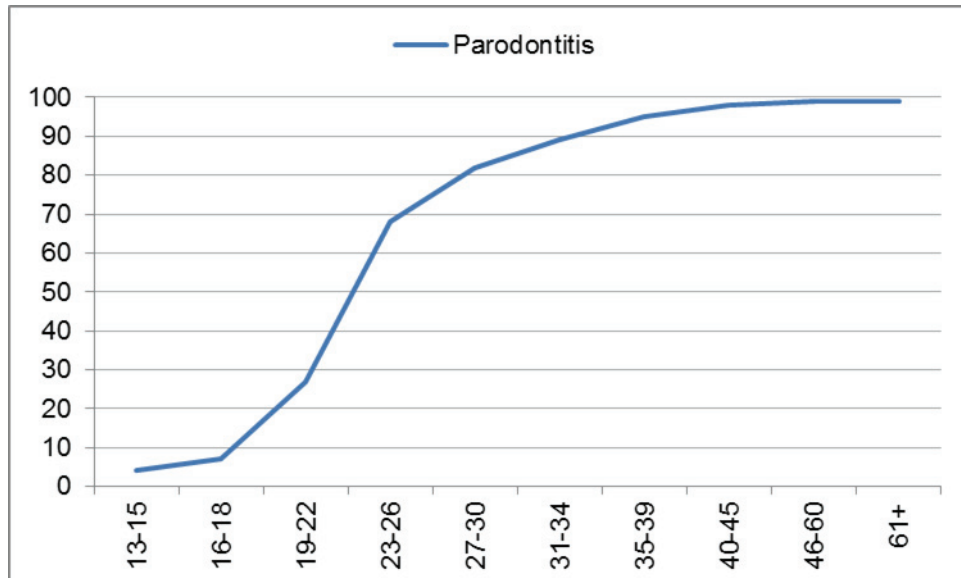


Abbildung 1: Gingivitis- und Parodontitisprävalenz in verschiedenen Altersgruppen
x-Achse = Alter, Y-Achse = Prävalenz in %, (Hellwig et al. 2009)

2.3 Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis

Die Pathogenese einer Parodontitis stellt eine komplexe Interaktion zwischen bakteriellen Mikroorganismen und der Immunabwehr des Wirtes dar (Kohal und Dennison 2000).

Zwar werden parodontopathogene Bakterien als wesentliche auslösende Agenzien parodontaler Erkrankungen angesehen, letztendlich wird die parodontale Destruktion aber durch die Wirtsantwort auf diese bakterielle Herausforderung hervorgerufen (Offenbacher 1996).

Die im Mund relevanten Problemkeime sind sehr selten den obligaten pathogenen Mikroorganismen zuzuordnen. Die Mehrzahl der parodontopathogenen Keime gehört zu der Gruppe der opportunistischen pathogenen Bakterien, die, solange die physiologischen Kontrollmechanismen zur Begrenzung des bakteriellen Wachstums intakt sind, keine Bedrohung für die Integrität der Strukturen der Mundhöhle darstellen. Erst endogene oder exogene Störungen des Systems lassen das vorhandene Gleichgewicht zwischen bakterieller Invasion und körpereigener Abwehr kippen (Gängler und Arnold 2005).

Das heißt, dass neben der Immunantwort auch genetische Faktoren oder Umweltfaktoren die Ausprägung des Krankheitsbildes beeinflussen. Dazu zählen Nikotinkonsum als Genussmittel, Immunsuppression (vor möglicher Organtransplantation), Stress, Medikation und Diabetes mellitus als weit verbreitete systemische Erkrankung. Auch Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigen eine erhöhte Frequenz an Parodontalerkrankungen im Vergleich zu Gesunden; umgekehrt haben Patienten mit Parodontalerkrankungen auch ein erhöhtes Risiko an rheumatoider Arthritis zu erkranken (Moen et al. 2003).

Die Entzündung beruht auf einer bakteriellen Besiedlung des gingivalen Sulkus. Diese führt zu einem Abbau des Knochens und der parodontalen Bindegewebsmatrix sowie zu einer Permeabilitätssteigerung der Gefäße und erhöhten Durchlässigkeit des Saumepithels für die Migration von Entzündungszellen. Auch externen Antigenen wird so der Weg durch das Saumepithel erleichtert. Sie finden erst in der externen und internen Basallamina des Saumepithels eine ausreichend effektive Diffusionsbarriere, die die funktionelle Verankerung der Zellen des Saumepithels mit dem darunterliegenden parodontalen Bindegewebe bildet. Kommt es zu entzündlichem Geschehen, wird die Integrität dieses Systems zerstört und die natürliche Inhibition der Proliferation der epithelialen Zellen des Stratum basale durch die Basallamina nach basal und lateral aufgehoben. Dadurch kommt es zur entzündlich bedingten Tiefenwanderung des Saumepithels, welche nur durch nicht entzündlich aufgelöstes Bindegewebe an der Grenzfläche Desmodont-Zementgrenze bzw. durch ein intaktes Blutkoagulum gestoppt wird (Schlagenhauf 2006).

2.4 Klinische Formen der Parodontitis

In der Parodontitisdiagnostik werden zwei klinische Formen unterschieden.

Die chronische Parodontitis tritt typischerweise gehäuft im fortgeschrittenen Alter auf, kann aber generell in jedem Lebensabschnitt, also in der Milch- wie auch in der bleibenden Dentition, klinische Relevanz besitzen, wobei Schwere und Prävalenz im Alter zunehmen. Sie ist für den Betroffenen zumeist schmerz-

frei und kann mit Blutung assoziiert sein. Durch die charakteristische Plaqueakkumulation und Konkrementablagerung kommt es zu chronischen Entzündungszeichen, wie Pusaustritt aus den Taschen bei akuter Exazerpation einer chronischen Parodontitis, damit verbundener Knochenabbau, was gesteigerte Zahnmobilität zur Folge hat. Häufige Begleiterscheinung ist Foetor ex ore sowie Zahnfleischtaschen und/oder Gingivarezessionen (Armitage 1999, Haffajee et al. 1991, Socransky und Haffajee 1991).

Vorläufer einer jeden chronischen Parodontitis ist eine Gingivitis, hervorgerufen durch Plaque, die sich in einer schmerzfreien, blutenden Hyperplasie äußert. Die Gingivitis ist entweder durch gute Zahnpflege und Flossing reversibel oder kann fließend in eine chronische Parodontitis übergehen (Hellwig et al. 2009).

Bei der aggressiven Parodontitis sind eher jüngere Patienten betroffen, weshalb sie früher unter Namen, wie zum Beispiel „früh beginnende Parodontitis“ oder „lokalisierte juvenile Parodontitis“, bekannt war. Doch auch hier muss festgestellt werden, dass keine strikte Zuordnung zu der Altersgruppe < 35 Jahre möglich ist, sondern ähnlich wie bei der chronischen Parodontitis prinzipiell jede Altersgruppe von dieser Krankheitsentität betroffen sein kann (Armitage 1999, MSD 2007).

Primäre Merkmale sind ein rascher Attachment- und Knochenverlust bei ansonsten klinisch gesunden Patienten, jedoch mit häufiger familiärer Disposition. Daneben existieren sekundäre Merkmale, die nicht immer vorhanden sind. Die Menge der bakteriellen Beläge stimmt nicht mit der Schwere der parodontalen Gewebsdestruktion überein. Erhöhte Anteile von *A. actinomycetemcomitans* und zum Teil auch *P. gingivalis* in der subgingivalen Mikroflora, Funktionsstörungen der neutrophilen Granulozyten beziehungsweise eine überschießende Makrophagenaktivität und eine Selbstlimitation des Attachment- und Knochenverlustes können vorkommen (Eickholz und Dannewitz 2004).

Beide Krankheitsbilder können durch vertikalen und horizontalen Knochenabbau gekennzeichnet sein sowie lokalisiert und generalisiert auftreten (Ismail et al. 1993).

2.5 Parodontopathogene Mikroorganismen

Die Entstehung und Progression parodontaler Entzündungsprozesse sind in der Regel auf eine Verschiebung des mikrobiellen Keimspektrums in der Mundhöhle, speziell im subgingivalen Bereich zurückzuführen. Während sich die „gesunde“ orale Mikroflora vorwiegend aus gram-positiven, fakultativen Anaerobiern zusammensetzt, überwiegt bei einer Parodontitis die Gruppe der gram-negativen Anaerobier, welche *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga*-Spezies, *T. denticola* und andere Spirochäten, *F. nucleatum*, *C. rectus* sowie *E. corrodens* einschließt (Haffajee und Socransky 1994).

Tatsache ist, dass mit den so genannten Leitkeimen oft Gruppen weiterer Bakterienspezies assoziiert sind, die ein kompliziertes Netzwerk von Stoffwechselprodukten miteinander verbindet und die erst im Zusammenspiel (Komplex) zu einer Erhöhung der Pathogenität führen. Diese Komplexe wurden nach Farben unterschieden.

Die Grundvoraussetzung für die Adhäsion parodontal schädigender Keime an der Wurzeloberfläche der Zähne bilden die Komplexe Blau (*Actinomyceten*), Gelb (*Streptokokken*), Grün (*E. corrodens*, *Capnocytophaga*-Spezies, *A. actinomycetemcomitans*) und Violett (*V. parvula* und *A. odontolyticus*). Durch deren Metabolismus wird eine ökologische Nische für die anspruchsvolleren Bakterien des Orangen und Roten Komplexes gebildet.

Das bedeutendste Keimspektrum für die parodontale Destruktion bilden der Orange (*Fusobacterium*-Spezies, *P. micra*, *P. nigrescens*, *P. intermedia*, *Campylobacter*-Spezies, *E. nodatum* und *S. constellatus*) und Rote (*P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola*) Komplex. Die Vertreter des Orangen Komplexes zählen als Frühbesiedler zu den Wegbereitern für die Bakterien des Roten Komplexes. Sie produzieren Exotoxine und Enzyme, ähnlich wie Bakterien des Roten Komplexes und reduzieren den Sauerstoffpartialdruck. Die Vertreter des Roten Komplexes sind hauptsächlich für die Produktion von Virulenzfaktoren zuständig.

Zusammenfassend lässt sich also entnehmen, dass der Rote und der Orange Komplex mit hoher Sondierungstiefe und positiver Sondierungsblutung korrelieren, wobei der Rote Komplex zusätzlich mit rascher Parodontitisprogression assoziiert ist.

Gelber, Grüner und Violetter Komplex spielen hingegen eher eine Rolle bei parodontaler Gesundheit, Gingivitis oder inaktiver Parodontitis (Darveau et al. 1997).

Die orale Residentmikroflora, also eine Mikroflora, die regelmäßig an einem Standort isoliert werden kann, deren Vertreter sich an eben diesem vermehren und zum Stoffwechsel der mikrobiellen Gemeinschaft beitragen, ist unterschiedlich in der Mundhöhle verteilt (Marsch und Martin 2003).

Es ist bekannt, dass parodontale Taschen mehr als 500 verschiedene Spezies an Mikroorganismen enthalten können (Moore und Moore 1994).

Fünf Vertreter oraler Mikroorganismen, für deren Pathogenität es eine starke Evidenz gibt, werden nachfolgend im Kontext erläutert: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* und natürlich *P. intermedia*.

2.5.1 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A. actinomycetemcomitans, dessen Erstbeschreibung 1912 durch Klinger erfolgte, gehört zur Gruppe der unbeweglichen, gramnegativen Stäbchenbakterien, welche einzeln, oder in Form von Kolonien wachsen. Aufgrund seiner fakultativ anaeroben Lebensweise ist das natürliche Biotop die Mundhöhle verschiedener Säugetiere, unter anderem des Menschen (Asikainen und Chen 1999).

Das Bakterium kommt vor allem bei Probanden vor, die an schweren Fällen von Parodontitis erkrankt sind. Darüber hinaus ist es aber auch in mittelschweren und milden Ausprägungsformen detektierbar. Dies wurde in einer Studie innerhalb einer brasilianischen Population an chronischer Parodontitis erkrankter Probanden ermittelt (Cortelli et al. 2010).

Auch wenn eine Abhängigkeit der Prävalenz vom Schweregrad der Parodontitis belegt ist, kann ein Zusammenhang zwischen Besiedlung und dem Alter sowie dem Geschlecht nicht festgestellt werden (Psoter et al. 2009).

Von *A. actinomycetemcomitans* sind sechs verschiedene Serotypen bekannt, deren Prävalenz zwischen gesundem und erkranktem Parodont differiert. Zum Beispiel ist bekannt, dass Serotyp b mit aggressiver Parodontitis assoziiert ist, während Serotyp c bei parodontal Gesunden dominiert (Paju et al. 2000).

Hauptvirulenzfaktor ist die Produktion von Proteasen, wie beispielsweise Leukotoxin.

Dieses Toxin kann via spezieller Rezeptoren Leukozyten und Monozyten selektiv vernichten und die Apoptose der Wirtszellen initiieren. Leukotoxin haftet, je nach Serotyp, entweder an der Membranoberfläche, kann aber auch freigesetzt werden (Ezzo und Cutler 2003).

A. actinomycetemcomitans kann sich an spezifische Rezeptoren an der Oberfläche der Wirtszelle anhaften und somit eine Internalisierung in die Zelle auslösen. Innerhalb der Wirtszelle kann *A. actinomycetemcomitans* durch Freisetzung von Phospholipase C die Apoptose dieser einleiten (Sreenivasan et al. 1993).

2.5.2 Porphyromonas gingivalis

P. gingivalis gehört, wie *P. intermedia*, zur Gruppe der schwarzpigmentierten Bakterien. Es ist ein unbewegliches, asaccharolytisches, kokkoides, gramnegatives, anaerobes Stäbchenbakterium.

In Studien wurden bis zu elf verschiedene Genotypen von *P. gingivalis* unterschieden (Griffen et al. 1999).

Die unterschiedliche genetische Ausprägung führt zu Virulenz-assoziierten Unterschieden innerhalb verschiedener Stämme (Kilian et al. 2006).

Bevor sich *P. gingivalis* in seinem bevorzugten Lebensraum subgingival im Sulcus von Säugetieren etablieren kann, adhäriert er supragingival an selektive *Streptococcus*-Spezies sowie an *F. nucleatum* und bildet dort eine etablierte Plaque (Daep et al. 2008).

P. gingivalis weist starke proteolytische Aktivität auf, bedingt durch die Produktion verschiedenster Proteasen, speziell den Gingipainen. Durch diese kommt es zum Abbau extrazellulärer Matrixproteine, zur Aktivierung der MMP's sowie zur Aktivierung oder Deaktivierung der Komplementkaskade und der Zytokine (Eley und Cox 2003).

Membrangebundene Cysteinproteasen (Rgp Arginin-Gingipain und Kgp Lysin-Gingipain) erleichtern die Besiedlung des Wirtes und die Invasion ins Gewebe (McAlister et al. 2009).

Der bei einer *P.gingivalis*-Infektion hervorgerufene Kollagenabbau ist zumeist bedingt durch die freigesetzten Kollagenasen des Keimes, wohingegen die nichtproteolytischen Enzyme für die Toxizität gegenüber Lymphozyten, Fibroblasten und Epithelzellen verantwortlich sind (Slots und Genco 1984).

Lipopolysaccharide an der Zelloberfläche fördern den Knochenabbau durch die reaktive Aktivierung von Osteoklasten und die Freisetzung von Gewebshormonen, wie Prostaglandinen, Interleukinen und Tumornekrosefaktor (Eley und Cox 2003).

2.5.3 Tannerella forsythia

T. forsythia, ein von Tanner et al. 1979 beschriebenes gramnegatives, fusiformes Bakterium, vermehrt sich obligat anaerob und konnte von Patienten mit fortgeschrittener Parodontitis isoliert werden.

Zuerst zur Klasse der Bacteroides zugeordnet, stellte sich jedoch heraus, dass es sich bei *T. forsythia* um eine eigene Klassifikation handelt (Sakamoto et al. 2002).

Das Wachstum von *T. forsythia* wird durch die Anwesenheit von N-Muramin-Säure stimuliert. Neben pathologischen Veränderungen des Zahnhalteapparates kann sich *T. forsythia* auch negativ auf das Herz-Kreislauf-System und Arteriosklerose auswirken (Gaetti-Jardim et al. 2009).

Charakteristisch ist das zahlreichere Auftreten dieses Mikroorganismus bei destruktiven Knochenläsionen als bei Gingivitis, was für ein Schweregrad assoziiertes Wachstum spricht (Huang et al. 2003).

Die Virulenz von *T. forsythia* zeichnet sich durch starke proteolytische und hydrolytische Aktivität aus, welche durch die Produktion zahlreicher Proteasen wie Cysteinproteasen, trypsin-ähnliche Proteasen, Sialidase, Glukosidasen, Amino-peptidasen, alkalische und saure Phosphatase bedingt ist (Braham und Monclab 1992).

Das Wachstum von *T. forsythia* wird durch *P. gingivalis* stimuliert, beide Bakterienspezies sind in der Lage die Apoptose von Wirtszellen einzuleiten (Zabel und Werner 1997).

Jedoch ist mittlerweile erwiesen, dass sich die Co-Infektion von *P. gingivalis* mit *T. forsythia* in der parodontalen Tasche hemmend auf die Invasion von *P. gingivalis* in die Wirtszelle auswirkt; *T. forsythia* profitiert also von der Koloniebildung mit *P. gingivalis*, hemmt dieses jedoch im Gegenzug (Saito et al. 2009).

2.5.4 Treponema denticola

T. denitcola, ein asaccharolytischen, anaerobes, bewegliches Stäbchen der Klasse *Spirochäten*, ist stark mit dem Vorkommen von *P. gingivalis* sowie mit dem unbeweglichen Brückenkeim *F. nucleatum* assoziiert (Kolenbrander et al. 1995).

Auf Grund seiner starken Mobilität und der Präsenz hoch proteolytischer Enzyme hat *T. denticola* die Möglichkeit tief in die parodontale Tasche einzudringen. Deshalb wird die Spezies häufig in Zusammenhang mit fortgeschrittenen Parodontitiden gefunden (Thomas 1996).

T. denticola adhärert in der parodontalen Tasche an Epithelzellen, Fibroblasten, extrazellulären Matrixmolekülen, vor allem aber auch an anderen Bakterien, wie zum Beispiel Fusobakterien und *P. gingivalis*. Hierbei entwickeln die Spezies Nahrungsinteraktionen und gleichzeitig antagonistische Verhältnisse zu anderen Bakterien (Greinier 1996).

T. denticola ist eines der am häufigsten untersuchten Spirochäten, dessen Virulenz auf unterschiedliche Faktoren zurückzuführen ist.

Ein bedeutender Faktor ist das Oberflächenmolekül Msp, ein Proteinkomplex der Zellmembran, welcher die Fähigkeit Treponemas zur Adhäsion an Epithelzellen und Erythrozyten bedingt und so deren Lyse hervorruft (Fenno und McBride 1996).

In der planktonischen Phase ist *T. denticola* durch vier in sich verflochtene, an der Cytoplasmamembran lokalisierte Flagellen zu aktiver Bewegung befähigt (Ishihara 2010).

Die proteolytische Fähigkeit von *T. denticola* beruht auf der Produktion verschiedener Proteasen mit einer hohen proteolytischen Potenz gegen Kollagen Typ I und IV, Keratin und Fibrin (Eley und Cox 2003).

Die größte Rolle hierbei spielen die Trypsin- und Chymotrypsin-ähnlichen Proteasen, die entzündungshemmende Substanzen wie Transferrin, Alpha-1-Antitrypsin, IgA und IgG hydrolysieren und so die Wirtsantwort des Wirtes negativ beeinflussen. Weiterhin blockiert *T. denticola* die Funktion der PMNs, hemmt die Lymphozytenproliferation und stimuliert Makrophagen zur Synthetisierung von IL-1 und TNF-alpha (Grenier 1996).

2.5.5 Prevotella intermedia

P. intermedia, ein Bakterium, welches bis zur Erstbeschreibung 1990 durch Shah und Collins zur Gattung Bacteroides zugehörig war, ist ein obligat anaerobes, schwarz pigmentiertes, gram-negatives, bewegliches Stäbchenbakteri-

um, welches häufig als prinzipieller Grund akuter dentoalveolärer Infektionen angesehen wird (Shah und Collins 1990).

P. intermedia ist ein Hauptbestandteil der menschlichen Mikroflora und kann an den verschiedensten Körperstellen, wie z.B. Mund- und Rachenraum, Gastrointestinaltrakt und den weiblichen Geschlechtsorganen, lokalisiert sein sowie eine bedeutende Rolle bei koronaren Herzkrankheiten spielen (Sahm 2005).

Der Erreger ist häufig Ursache endogener Infektionen, vor allem über die flora-besiedelten Schleimhäute und verursacht so neben den dentalen auch otorhinolaryngologische Krankheitsprozesse (Yanagisawa et al. 2006).

Als bekannter oralpathogener Erreger ist *P. intermedia* also auch bei Infektionen vorherrschend, deren Infektion ausgehend von der Mundhöhle absteigend des Respirationstraktes verlaufen. Bekannt sind Nachweise bei chronischen Infektionen des Respirationstraktes, Peritonsillar- und Lungenabszesse, sogar bei chronischer Otitis media (Brook 2002).

In einer Studie von Brook und Frazier (2003) gelang bei Patientenfällen mit akuter Exazerbation einer chronischen Bronchitis der Titernachweis für Antikörper gegen *P. intermedia* und *F. nucleatum* (Brook und Frazier 2003).

Weiterhin wurden einzelne *Prevotella*-Arten bei eitrigen Infektionen, wie z.B. bei pelvinen Eiterungen, nachgewiesen (Zabel und Werner 1997).

Auch Assoziationen zwischen der Prävalenz von *P. intermedia* und Foetor ex ore konnten hergestellt werden (Tanaka et al. 2008).

In Studien wurde regelmäßig nachgewiesen, dass *Prevotella*-Spezies bei Patienten mit akuter nekrotisierender ulzerativer Gingivitis, Schwangerschaftsgingivitis und chronischer Parodontitis in subgingivaler Plaque auffindbar waren. Die dentoalveolären Infektionen stehen mit *Prevotella*-Arten in Verbindung (Yanagisawa et al. 2006).

P. intermedia ist eines der Bakterien, welches die parodontale Tasche besiedelt und Virulenzfaktoren produziert, welche parodontalen Gewebsabbau verursachen (Zabel und Werner 1997).

Ebenso erwiesen ist, dass Patienten mit parodontalen Erkrankungen, bei denen *P. intermedia* im Sulkus detektiert werden konnte, ein erhöhtes Risiko für Periimplantitis aufweisen. Schon im ersten Monat nach Implantatfreilegung und Aufbringen der Suprastruktur konnte eine erhöhte Rate an *P. intermedia* im periimplantären marginalen Mukosagewebe nachgewiesen werden (Takanashi et al. 2004).

Der erhöhte Nachweis von Bakterien der Gattung *Prevotella* korreliert deutlich mit dem Misserfolg dentaler Implantologie (Pfau und Avila-Campos 2005).

Das Vorhandensein von *P. intermedia* in Dentintubuli radikulären Dentins sowie der gezielte Nachweis des Erregers in asymptomatisch infizierten Wurzelkanälen zeigt, dass *P. intermedia* auch außerhalb der Parodontologie eine Rolle als pathogener Keim spielt. Die anaeroben Verhältnisse im Wurzelkanal sowie das Vorhandensein von Kollagenbestandteilen bilden optimale Voraussetzungen für die Kolonisierung des Bakteriums (Love 2004).

Ähnliche Ergebnisse zeigte auch eine Studie von Gomes et al. (2004), in der Bakterien der Gattung *Prevotella* unter anaeroben Verhältnissen zumeist in unbehandelten Wurzelkanälen mit apikaler Parodontitis die stärkste Ausbreitung erfuhren. Auch konnte immer eine Mixflora nachgewiesen werden, was ein alleiniges Auftreten von *P. intermedia* bei infizierten Wurzelkanälen ausschließt (Gomes et al. 2004).

Aber auch bei akuten Infektionen des Wurzelkanals spielt *P. intermedia* eine entscheidende Rolle.

Die Lipopolysaccharide der äußeren Membran von *P. intermedia* regen die IL-8 Produktion der pulpalen Fibroblasten an, was zu einer Initiierung der Entzündungskaskade im Wurzelkanal führt (Thaweboon et al. 2006).

Eine genaue Charakterisierung dieser Spezies wurde durch Shah und Collins vorgenommen. Diese beschreiben *P. intermedia* als sporenlose unbewegliche Stäbchen mit terminalen pH-Werten von 4,5 - 5,2 in Glukosebouillon, Bildung von Malatdehydrogenase und Glutamatdehydrogenase zur Energiegewinnung mittels Glukose- und Stickstoffmetabolismus, Fehlen von Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphoglukonatdehydrogenase sowie Vorhandensein von m-Diaminopimelinsäure (Shah und Collins 1990).

Bedeutung bei der Pathogenese der Parodontitis

Wie aus Studien hervorgeht, ist *P. intermedia* zwischen Personen mit enger körperlicher Bindung, wie sie zum Beispiel bei Ehepartnern (horizontaler Übertragungsweg) und/oder zwischen Eltern und ihren Kindern (vertikaler Übertragungsweg) zu finden ist, übertragbar. So spielt *P. intermedia* nicht nur eine große Rolle bei fortgeschrittenen Stadien der Parodontitis, sondern und vor allem auch bei der Etablierung frühzeitiger bis moderater parodontaler Erkrankungen (Fukui et al 1999).

Ihre Pathogenität erreichen die Bakterien durch die Produktion parodontopathogener Proteasen, die zur Gruppe der Cystein- und Serinproteasen gehören (Yanagisawa et al. 2006) und durch ihre Fähigkeit, sich an der Oberfläche oraler Epithelzellen anzuheften und via Invagination in die Zellen einzudringen.

Nachgewiesene Type C Fimbrien von *P. intermedia* 17 sind in die Invasion der KB Zellen verwickelt (Dorn et al 1998). Dadurch kann sich das Bakterium während der Entzündungsreaktion der humoralen Abwehr des Wirtes entziehen und tiefer in das Gewebe eindringen.

Ein 57-kDa schweres Laktoferrinbindungsprotein wurde auf der Zelloberfläche von *P. intermedia* identifiziert, welches eine hohe Bindungsaffinität zu Fibrinogen, Fibronektin, Kollagen Typ I und IV sowie Laminin aufweist, was die Aggregation an diesen Strukturen erleichtert (Aduse-Opoku et al. 1995).

Des Weiteren bewirkt der direkte Kontakt zwischen Bakterium und Zelloberflächenmembran die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, welche eine Rolle bei der Induktion der Entzündung spielen (Gursoy et al. 2009, Matsushita et al. 1994).

Proteasen sind die ausschlaggebenden Virulenzfaktoren vieler oraler Mikroorganismen. Im Falle von *P. intermedia* sind sie nicht nur für den Abbau von Proteinen, was zu einem zum Verlust des Zahnhalteapparates führt, verantwortlich, sondern übernehmen auch eine Art Schutzfunktion für das Bakterium gegenüber der körpereigenen Abwehr in Form des Komplementsystems.

So ist *P. intermedia* über die Cysteinprotease Interpain A in der Lage das Schlüsselprotein C3 aller Aktivierungswege des Komplementsystems zu attackieren, indem es die Alpha-Ketten von C3 spaltet und so das Komplementsystem inhibiert (Potempa et al. 2009).

Weiteren Einfluss auf das Immunsystem des Wirtes nimmt *P. intermedia* über die unspezifische Spaltung von Immunglobulinen, wie IgG und IgA. Für die Aggregation ist ein 65-kDa-Oberflächenprotein gegen die Immunglobuline beschrieben worden (Jansen et al. 1995, Labbé und Grenier 1995).

3. Zielstellung

Neben *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* besitzt auch *P. intermedia* Bedeutung als proteolytisch aktive Spezies in der Pathogenese der Parodontitis.

Im Gegensatz zu den umfangreichen Untersuchungen zu den Proteasen von *P. gingivalis* ist jedoch über die Proteasen von *P. intermedia* nur wenig bekannt.

Ziel der Studie war die Prävalenz von *P. intermedia* in subgingivalen Plaqueproben zu ermitteln sowie die Gene für die drei Cysteinproteasen Interpain A, Interpain B und Interpain C zu detektieren. Die Plaqueproben sollten mittels PCR-Verfahren auf Vorkommen und Menge von *P. intermedia* getestet werden, wobei *P. intermedia* -positive Proben dem genetischen Nachweis der Cysteinproteasen unterzogen werden sollten.

Des Weiteren galt es die proteolytische Aktivität von Bakterienstämmen, die zuvor aus klinischen Isolaten und Laborstämmen kultiviert wurden, zu untersuchen.

Hierbei stellte zwar die cysteinspezifische Proteaseaktivität das Hauptanliegen dar, doch auch die Serin- und Metallproteasenaktivitäten sollten in die Versuche mit einbezogen werden.

Ein Nachweise von Interpain A als natives Protein im Gingivafluid mittels der Western Blot - Methode sollte die Studie vervollständigen und beweisend für die Enzymproduktion von *P. intermedia* sein.

4. Materialien und Methoden

4.1 Patientenproben

Am Anfang der Studie stand die Akquirierung von verwertbaren klinischen Proben im Vordergrund. Nach Bewilligung des Ethikantrages und einer ausführlichen Patientenaufklärung erfolgte die Entnahme der Proben mittels Papierspitzen. Diese wurden randomisiert aus parodontalen Taschen ($\geq 5\text{mm}$ Sondierungstiefe) entnommen. Dabei verblieben die Papierspitzen für ca. 30 Sekunden im Sulkus. Diese wurden danach in ein Eppendorf-Tube gegeben und sofort in das Labor transportiert.

Die Pathogenitätsformen wurden anhand der Kriterien zur Einteilung der Parodontitisformen nach Armitage (1999) differenziert.

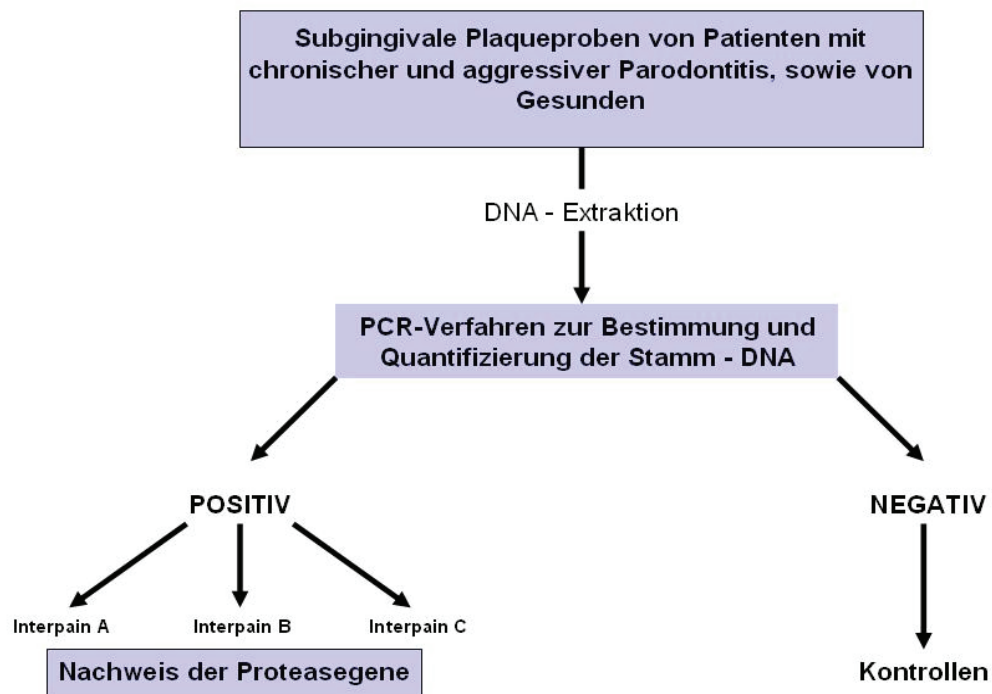


Abbildung 2: Probensammlung und Probenverwertung

4.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde mit dem „Genomic Mini“® - Set (HELICONIUS, A&A BIOTECHNOLOGY, Gdynia, Poland) durchgeführt. Die Versuchsdurchführung erfolgte exakt nach Protokoll.

Zuerst wurde die mit Bakterien behaftete Papierspitze im Eppendorf -Tube mit 100 µl Tris-Puffer (TrisHCl pH 8,5), 200 µl Lysepuffer und 20 µl Proteinase K versetzt. Die Proteinase K (gehört zur Familie der subtilisin-ähnlichen Serinproteasen, besitzt endo- und exoproteolytische Aktivität) erfüllt den Zweck, Proteine in Zelllysaten abzubauen und die Bakterienhülle zu spalten, um auf diesem Weg die DNA freizusetzen.

Es erfolgte ein Vortexen der Suspension für ca. 20 Sekunden, um eine sichtbare Homogenisierung der Bakterien zu erreichen und eine anschließende Inkubation bei 37°C für 20 Minuten. Danach wurde für ca. 5 Minuten bei 70°C inkubiert, um die Aktivität der Proteasen durch Denaturierung zu stoppen und die Mischung wurde nochmals gevortext.

Um feste Bestandteile (Zellüberreste) aus der Suspension zu entfernen, wurde diese für zwei Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf den Filtereinsatz pipettiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation für eine Minute bei gleicher Umdrehungszahl. Dabei band die DNA an die Membran des Filters, so dass die Flüssigkeit im Tube verworfen werden konnte.

Um die im Filter enthaltene DNA zu reinigen, wurde zweimalig mit 400 µl Waschpuffer (Alkohol, der dazu dient, noch enthaltene Proteine zu denaturieren und aus der Membran zu spülen) gewaschen. Nach der ersten Zugabe des Waschpuffers wurde für eine Minute, nach der zweiten Applikation für zwei Minuten, zentrifugiert. Hierbei war wichtig, dass zwischen jedem Schritt das Eppendorf-Tube gewechselt und die Restflüssigkeit verworfen wurde.

Der Filtereinsatz wurde anschließend auf ein 1,5 ml Eppendorf-Tube gesetzt und die DNA mittels 100 µl, auf 75°C vorgeheizten, Tris-Puffer aus dem Filter eluiert. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde durch

Zentrifugation die DNA im Reaktionsgefäß aufgefangen. Anschließend wurde die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.3 Polymerase-Chain-Reaction

Die Polymerase-Chain-Reaction (PCR) dient der Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Sequenz um ein 10- Millionenfaches (Fermentas LIFE SCIENCES). Auf diese Art und Weise ist es möglich, den gewünschten DNA-Abschnitt später im Agarose-Gel sichtbar zu machen. Zur Versuchsdurchführung werden Primer, *Taq*-DNA-Polymerase, Nukleotide, MgCl₂, *Taq*-Puffer und dH₂O in bestimmter Konzentration zueinander verwendet.

4.3.1 Material

Für den Nachweis von *P. intermedia* in den Plaqueproben wurden die von Ashimoto et al. (1996) definierten Primer verwendet (Tabelle 1). Diese wurden bereits mehrfach eingesetzt und zeigten eine gute Übereinstimmung mit anderen Nachweisverfahren.

Zur Bestimmung der Primer für den Nachweis der Proteasen von *P. intermedia* wurden DNA-Sequenzen aus der Datenbank von „Oral Pathogene Sequence Databases“ herangezogen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht zu den verwendeten Primern zum qualitativen Bakteriennachweis mittels konventioneller PCR und quantitativem Bakteriennachweis mittels Real-time PCR für *Prevotella intermedia*

Primerpaare (forward and reverse)	Basenposition und Länge des Amplifikats	Quelle
<i>P. intermedia</i> 57°C Pi-1: 5'-TTT GTT GGG GAG TAA AGC AGC GGG Pi-2: 5'-TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T	478-1034 (557 bp)	Ashimoto et al. 1996
pPI0032 (interpain A <i>P. intermedia</i>) 55°C pPI-1: 5'-GAA GGA CAA CTA CAG CGG AAA pPI-2: 5'-TCC TTT CGT TAG TTC GCT GA	774-1020 (247 bp)	pPI0032
iPiB (interpain B <i>P. intermedia</i>) 56°C iPiB-1: 5'-ACA AGG CTT CTG ATG GCA AG iPiB-2: 5'-AAG TAA TGT TCT TGC CTA CGA GTG	2525-2773 (249 bp)	PI0881
iPiC (interpain C <i>P. intermedia</i>) 57°C	1867-2264	PI1993

iPiC-1: 5'-GCC CAA GGC AAT GTT GTA AT	(398 bp)
iPiC-2: 5'-TTC ACG ACA TTT TGC TGC AC	

Die Taq-Polymerase ist eine hitzebeständige DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*, die 1969 erstmals von Thomas Brock und Hudson Freeze isoliert wurde. Dem Enzym kommt eine bedeutende Rolle bei der DNA-Vervielfältigung zu, weil es bei 95,7°C eine Halbwertszeit von 9 Minuten aufweist (Lawyer et al., 1993).

Nukleotide sind Moleküle, die im genetischen Code als Grundbausteine für DNA und RNA fungieren. Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche PCR ist eine exakte Konzentration jedes Nukleotids (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) von 200 µM im Mastermix.

Magnesiumchlorid liegt im Set als Lösung in einer Konzentration von 25 mM vor. Mg^{2+} -Ionen sind essentiell für die Funktion der Polymerase und dienen der Optimierung der PCR. Zu wenige Mg^{2+} -Ionen führen zu einer verminderten Zahl an PCR-Produkten, zu viele steigern die Anzahl unspezifischer DNA-Stränge.

Wie jeder Puffer dient auch dieser zur Aufrechterhaltung des korrekten pH-Wertes von 8,8 bei 25°C, um so eine geeignete chemische Umgebung für die DNA-Polymerase sicherzustellen.

4.3.2 Durchführung

Um unterschiedliche Reaktionen parallel ablaufen zu lassen, wird ein Mastermix (MM), welcher Primer, Taq-DNA-Polymerase, Nukleotide, $MgCl_2$, Taq-Puffer und dH_2O enthält, präpariert. Diese Methode ist zeitsparend und minimiert mögliche Pipettierfehler. Der Mastermixansatz für 12 Patientenproben ist in Tabelle 2 dargestellt. Zu beachten ist, dass jeweils ein Pipettierverlust von ca. 10% einberechnet wird.

Tabelle 2: Mastermixansatz: Beispiel für 12 Patientenproben

Komponente	Volumen (1x)	Finalvolumen (12x)
------------	--------------	--------------------

Primer 1 (forward)	1,25 µl	15 µl
Primer 2 (reverse)	1,25 µl	15 µl
Taq- DNA- Polymerase	1 µl	12 µl
Nukleotide	2,5 µl	30 µl
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	2,5 µl	30 µl
Taq-Puffer	2,5 µl	30 µl
dH ₂ O	11,5 µl	138 µl
	22,5 µl pro Tube	270 µl Gesamt MM

Zur Durchführung der PCR wurden die DNA-Extrakte auf Eis aufgetaut, vorsichtig gemischt und 2,5 µl Template-DNA entnommen. Die Amplifikation erfolgte im Tube mit 25µl Reaktionsvolumen, welches sich aus 2,5µl Template-DNA und 22,5µl MM zusammensetzte. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten 22,5 µl Mastermix und 2,5 µl dH₂O anstelle der DNA. Für die Postivprobe wurde der Stamm *P. intermedia* ATCC 25611 verwendet.

Konventionelle PCR

Anschließend konnte die konventionelle PCR im Eppendorf Master Cycler EP, (Hamburg-Eppendorf, Deutschland) gemäß folgendem PCR-Protokoll realisiert werden:

Die komplette Denaturierung der Template-DNA beim Start der PCR war von außerordentlicher Bedeutung. Dies erfolgte in der initialen Denaturierungsphase bei 95°C für zwei Minuten. Es schloss sich die Replikation der DNA in 36 Zyklen an. Am Anfang jedes Zyklus stand die erneute Denaturierung für 30 Sekunden bei 95°C. Es folgte die Primeranlagerung bei 57°C für eine Minute. Wenn die Temperatur auf 72°C angestiegen war, wurde diese für zwei Minuten beibehalten, wobei es zur DNA-Verlängerung mittels Anlagerung der Nukleotide kam. Waren die 36 Zyklen durchlaufen, folgte die Phase der Elongation für 10 Minuten bei 72°C (Abbildung 3).

Die beschriebenen Zeiten und Temperaturen gelten für den Nachweis von *Prevotella intermedia* (Pi-1 und Pi-2) und *Interpain C* (iPiC-1 und iPiC-2). Für *Interpain A* liegt die Optimaltemperatur zur Anlagerung der Primer an den Strang bei 55°C, für *Interpain B* bei 56°C.

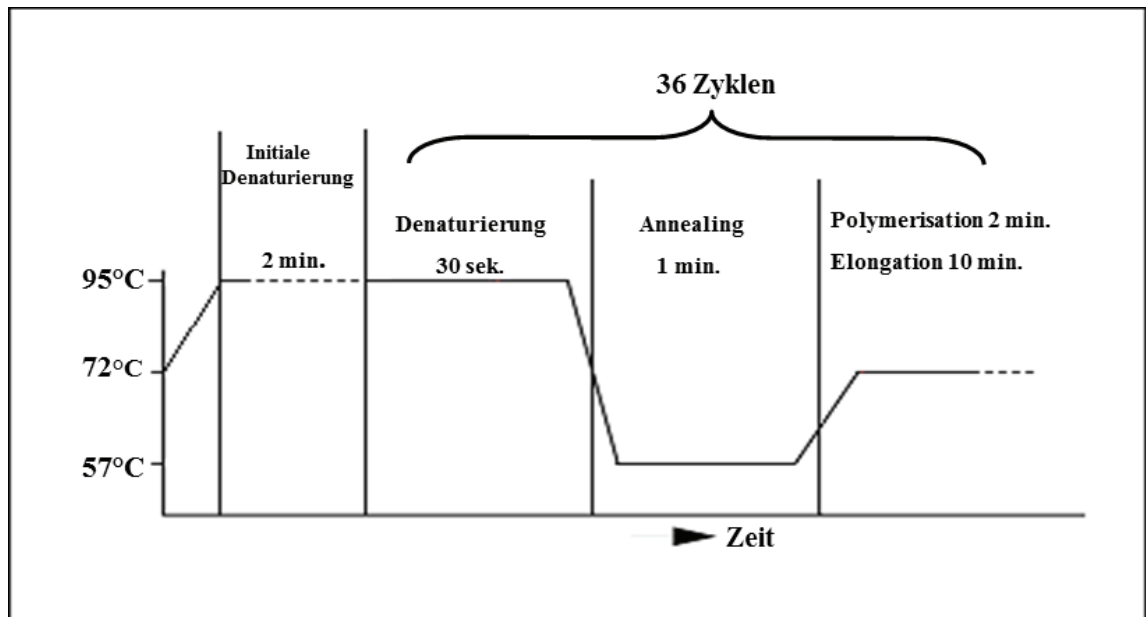


Abbildung 3: Verlaufsprotokoll Thermocycler

4.3.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient dem Nachweis der DNA-Amplifikation auf der Grundlage eines zweiprozentigen Agarosegels. Zur Anfertigung des Gels wurden 1,25g Agarose in 75ml TBE-Puffer gelöst und anschließend erhitzt. Um das Amplifikat später im Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel mit 5µl des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR® Green I (Bio-Rad, Eugene, Oregon, USA) versetzt. Das noch nicht auspolymerisierte, warme Agarosegel wurde zum Abkühlen und zur Formgebung in eine Gelkammer mit 15 Slots gegossen.

Die Amplifikate wurden dem Thermocycler entnommen. Aus dem Reaktionsvolumen von 25µl wurden 5µl in ein separates Eppendorf-Tube gegeben und mit 3µl Orange G als Laufkontrolle (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, New Jersey, USA) vorsichtig vermischt und in einen Slot eingebracht. Als Kontrolle der amplifizierten DNA-Abschnitte wurde ein DNA Marker mitgeführt, als Laufpuffer diente 0,5facher TBE-Puffer. In der Elektrophoresekammer lief das Gel für ca. 40 Minuten bei 120 V.

Nach erfolgter Auftrennung der Amplifikate wurde das Gel unter einem UV-Transilluminator betrachtet und fotografiert. Die qualitative Auswertung erfolgte anhand der Vergleiche der Positivprobe mit den Patientenproben. Die Patientenproben gelten als positiv, wenn die Position der spezifischen DNA-Banden mit der Position der Bande der Positivprobe übereinstimmte und die Größe des Amplifikates der erwarteten entsprach (Abbildung 4).

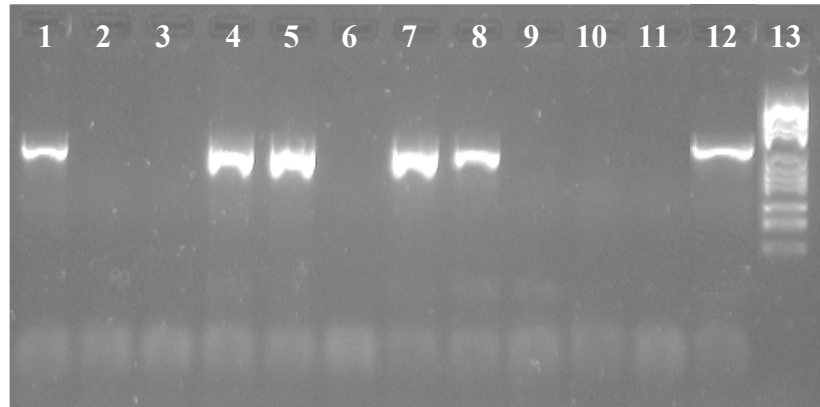


Abbildung 4: Elektrophoresegel *P. intermedia* - Stamm- DNA

Positivprobe	→ 12
Negativprobe	→ 11
Marker	→ 13
pos. Patienten	→ 1; 4; 5; 7; 8
neg. Patienten	→ 2; 3; 6; 9; 10

Analog hierzu wurden die Proben ebenfalls nach dem Realtime-PCR-Verfahren mittels Rotor-Gene durchlaufen, um eine quantitative Analyse der DNA vorzunehmen.

Die Real-time PCR wurde im Rotorgene 2000 (Corbett Research, Sydney, Australien) durchgeführt. Zu beachten ist hierbei, dass der Puffer SybrGreen in einer Konzentration von 0,1% enthielt. Dieser Farbstoff bindet spezifisch an doppelsträngige DNA und die entstehende Fluoreszenz wurde bei jedem Zyklus bei der Temperatur von 72 °C gemessen. Die Anzahl der Bakterien wurde anhand der Positivkontrollen in bekannten Konzentrationen gemessen (Abbildung 5).

Dieses Verfahren gründet auf der Charakterisierung der Nukleinsäureprodukte via Fluoreszenzmessung nach erfolgter PCR und anhand ihres Schmelzverhaltens (Abbildung 6).

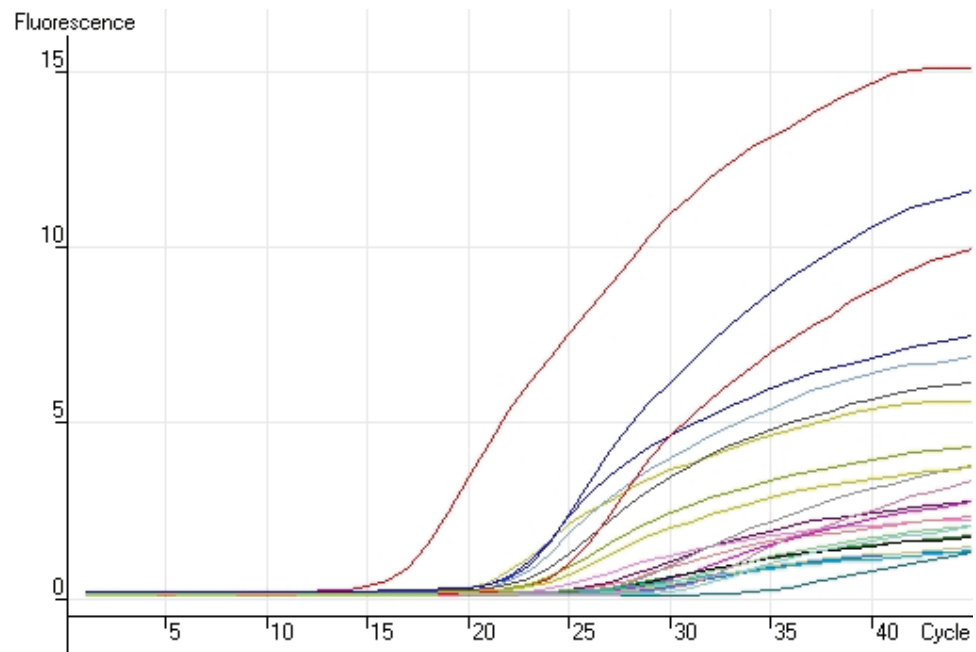


Abbildung 5: Fluoreszenzmessung Real-time PCR *P. intermedia*

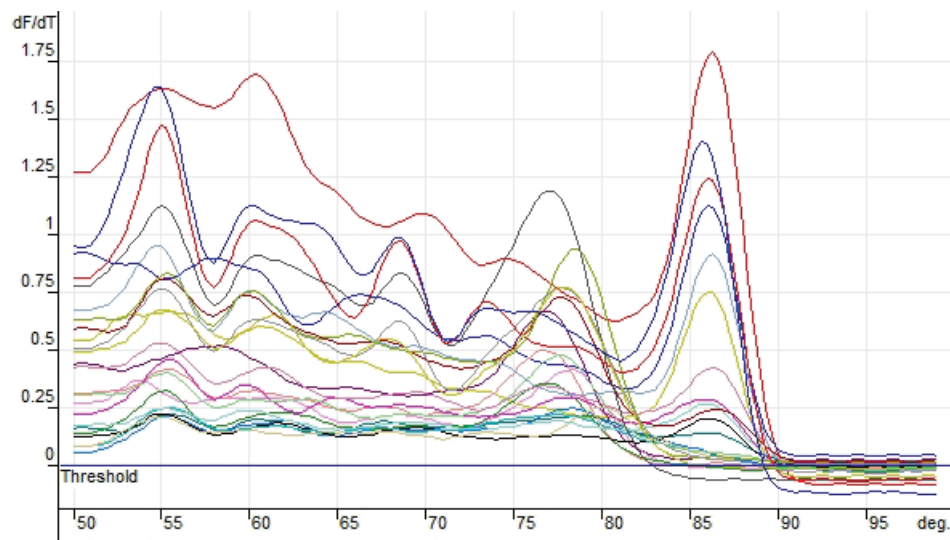


Abbildung 6: Schmelzkurve *P. intermedia* (charakteristischer Schmelzpunkt bei 87°C)

4.4 Western Blot

Diese Versuche wurden an der Jagiellonian-Universität in Krakau (Polen) durchgeführt. Beim Western Blot werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen geeigneten Träger, z.B. Nitrocellulose oder Nylon, übertragen (Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, 2004).

Die Proteine des Trenngels werden mittels hydrophober Wechselwirkung und Wasserstoffbrückenbindung an der Nitrocellulose fixiert und immobilisiert. Die Fixierung der Makromoleküle an der Nylonmembran erfolgt zunächst elektrostatisch und dann kovalent.

Das Trennmuster der Protein-Moleküle bleibt hierbei erhalten. Das Gel wird so exakt repliziert. Unter geeigneten Bedingungen bleibt beim Transfer sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine, z.B. deren enzymatische Aktivität, erhalten. So kann mit Hilfe der Blotting-Technik auf einfache Art und Weise eine qualitative und quantitative Bestimmung einzelner Proteine erfolgen, da die Proteine nach dem Transfer weiterhin für die Interaktion mit Lektinen, Antikörpern, Liganden oder Enzymsubstraten zugänglich sind.

4.4.1 Dot Blot

Dot-Blot ist der englische Begriff für das punktförmige Auftragen isolierter DNA- oder Protein-Proben auf Trägermaterialien wie Papier, Nitrozellulose- oder Nylonfilter.

Ziel dieser vorbereitenden Maßnahme war, die korrekte Konzentration an primären und sekundären Antikörpern festzulegen sowie die nötige Proteinmenge in ng in der Patientenprobe zu ermitteln. Hierzu wurde im Versuch ein Proteingemisch, in dem sich das zu detektierende Antigen befand, auf eine Membran aufgetragen und die übrigen freien Bindungsstellen mittels unspezifischen Proteins blockiert (im Versuch wechselseitig mit Magermilchpulver oder BSA).

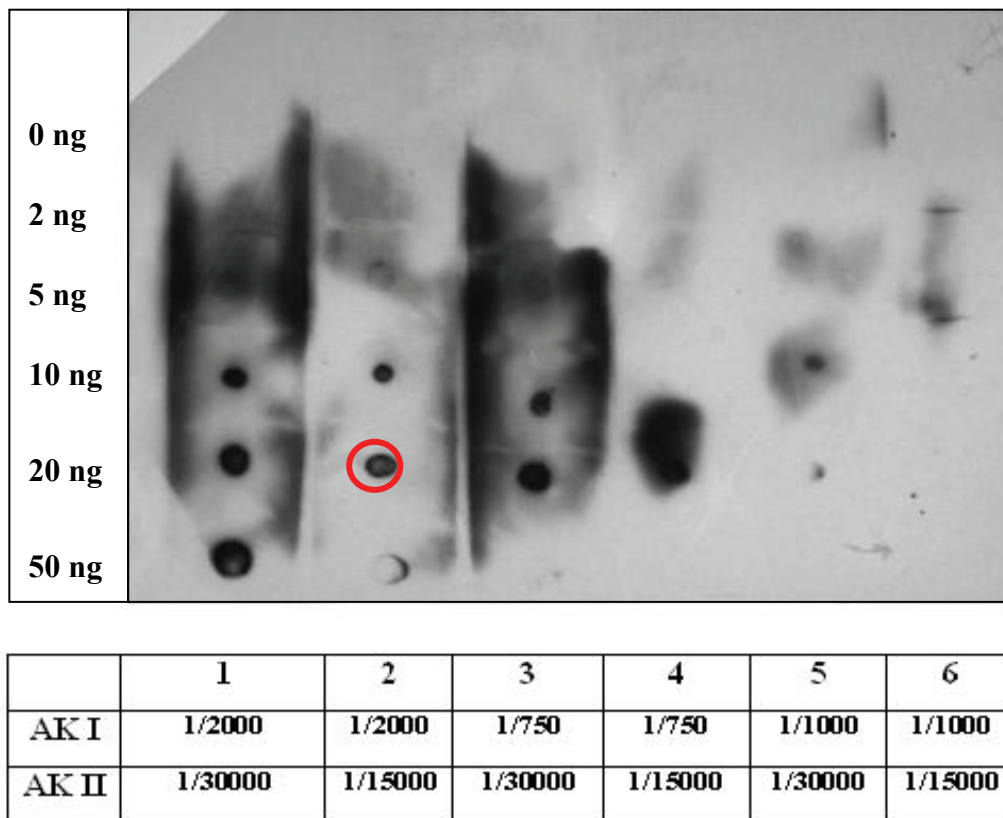


Abbildung 7: Ergebnis nach Dot Blot

Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, ergeben sich je nach Zusammensetzung der Antikörper und aufgetragener Proteinmenge verschiedene Hintergrunddarstellungen und verschiedenartige Darstellungen der Kontraste der Punkte je nach Menge an Protein. Demzufolge wurde anhand der Konzentrationen der Antikörper I (AK I) und II (AK II), sowie der Proteinmenge (in ng) die beste Kombination für das weitere Vorgehen im Western Blot ermittelt. Die beste Konstellation ergab sich bei 20ng Proteinmenge, einer AK I-Verdünnung von 1/2000 und einer AK II-Verdünnung von 1/15000.

4.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Am Anfang jeder Versuchsdurchführung stand die Vorbereitung der Arbeitsmaterialien. Hierzu zählte beim Western Blot das korrekte Zusammensetzen (Prüfung auf Dichtigkeit) der Zellen, in denen die Gelherstellung erfolgt.

Tabelle 3 zeigt die unterschiedlichen Ansätze einer Patientenprobe in verschiedenen Volumina sowie den für die Gel-Elektrophorese wichtigen Marker und ein gereinigtes Enzym als Positivprobe.

Die Positivprobe sowie die verschiedenen Konzentrationen der Patientenprobe als auch der LMW-Marker wurden bei 100°C für fünf Minuten denaturiert. Nach dem Aufkochen der Probenansätze wurde gewartet, bis sich diese auf Raumtemperatur abgekühlt hatten, dann wurde für 10 Sekunden kurz anzentrifugiert und anschließend wurden die Proben in die Slots des Gels zwischen den Glasplatten eingebracht.

Die Glasplatten wurden samt Halteapparatur in die Elektrophoresekammer eingesetzt.

Danach wurde die Innenkammer mit 150ml Kathoden-Flüssigkeit gefüllt. Diese setzte sich aus 30ml Kathodenpuffer (0,1M Tris, 0,1M Tricine, 0.1% SDS, pH ~8,25) und 120ml dH₂O zusammen.

Die Anodenflüssigkeit wurde in die Außenkammer gefüllt. Hierzu wurden 800ml benötigt. Davon waren 160ml Anoden-Puffer (1M Tris – HCl, pH 8,9) und 640ml dH₂O.

Die Elektrophorese lief anfänglich bei einer Spannung von 80V und wurde nach 25 Minuten auf 120V angehoben.

Nachfolgend wurden die Gele auf eine PVDF-Membran übertragen und immobilisiert.

Um die hydrophobe Membran für die Aufnahme der Proteine vorzubereiten, musste diese durch Einlage in Methanol hydrophiliert werden.

Das eigentliche Blotting erfolgte in der „Trans-Blot SD Semy-Dry Transfer Cell“ (Semi-Dry-Methode). Hierbei wurden Filterpapier, Gel und Membran im Sandwich-System geschichtet und mit Elektrotransfer-Puffer (25mM Tris, 192mM, Glycin 20% Methanol) benetzt. Die Laufzeit betrug 40 Minuten bei 20V.

Zur Sicherstellung des erfolgreichen Proteintransfers wurde die Membran mit Ponceau-Rot angefärbt (mehrmaliges Entfärben mit TTBS (20mM Tris, 0,5% NaCl, 0,9% Tween)), um die Proteinbanden auf der Membran sichtbar zu machen. Nach erfolgtem Elektrottransfer wurden die restlichen Proteinbindungsstellen auf der Membran durch Zugabe einer Albuminsuspension (1g Rinderserumalbumin in 50ml TTBS) gesättigt und über Nacht inkubiert.

Die folgenden Schritte wurden, bis auf die Substratreaktion, alle auf dem Schüttler durchgeführt.

Die Reaktion des primären Antikörpers (Maus) beruht auf seiner Affinität zu Interpain A von *P. intermedia*. Dieser wurde in der ermittelten Konzentration von 1/2000, verdünnt in BSA, auf die PVDF-Membran aufgebracht und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

Es folgte ein dreimaliges Waschen der Membran mit TTBS für jeweils 10 Minuten.

Im Anschluss stand die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper in einer Konzentration von 1/15000, verdünnt in BSA. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde. Der Sekundärantikörper (Anti-Maus-IgG) ist Träger der HRPeroxidase und bindet spezifisch an das FC-Fragment des Primärantikörpers (Abbildung 8).

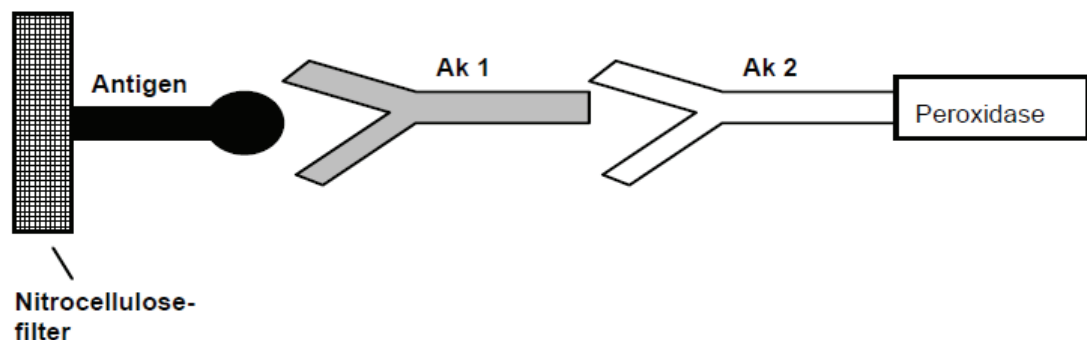


Abbildung 8: Antigen-Antikörper-Reaktion

Luminol als chemiluminescentes Substrat für die Peroxidase beginnt nach dessen Spaltung zu leuchten. In der Dunkelkammer erfolgte die Entwicklung des Blots auf Kodak Fotopapier. Zuerst wurde in einer Black-Box die Illumineszenz der Proteine auf der Membran auf den Film übertragen und anschließend der Film entwickelt und fixiert.

4.5 Aktivitätsbestimmung

Die Aktivitätsbestimmung wurde im Zeitraum von Oktober/November 2008 sowie Januar/Februar 2009 an der Jagiellonian-Universität Krakau durchgeführt.

Es sollte ermittelt werden, in welchem Maße Enzymaktivität einer Bakteriensuspension sich im Überstand (freigesetzte Aktivität) und im Sediment (Bakterienzellen) nach Zentrifugation nachweisen lässt.

Zunächst mussten Stämme kultiviert werden. Zur Kultivierung wurden Waschproben aus dem Sulkus von Parodontitispatienten gewonnen. Dies geschah bei insgesamt 10 Patienten, wobei bei jedem Patienten Waschproben aus unterschiedlich tiefen Taschen entnommen und entsprechend gekennzeichnet wurden. Von diesen wurden mittels PCR die Proben mit der höchsten Keimzahl detektiert und zum weiteren Versuchsverlauf, in den auch schon vorhandene Laborstämme mit einbezogen wurden, herangezogen.

Für die Kultivierung wurden Schädleragar-Platten als Nährmedium verwendet. Von jeder Waschprobe wurden Suspensionen unterschiedlichen Verdünnungsgrades (Waschproben verdünnt in steriler PBS) auf Platten, versetzt mit Vancomycin (7,5mg/l), mit Kanamycin (100mg/l) und ohne Antibiotikum verteilt. Unter Gewährleistung anaerober Verhältnisse und 37°C wurden die Proben 8-10 Tage im Brutschrank inkubiert.

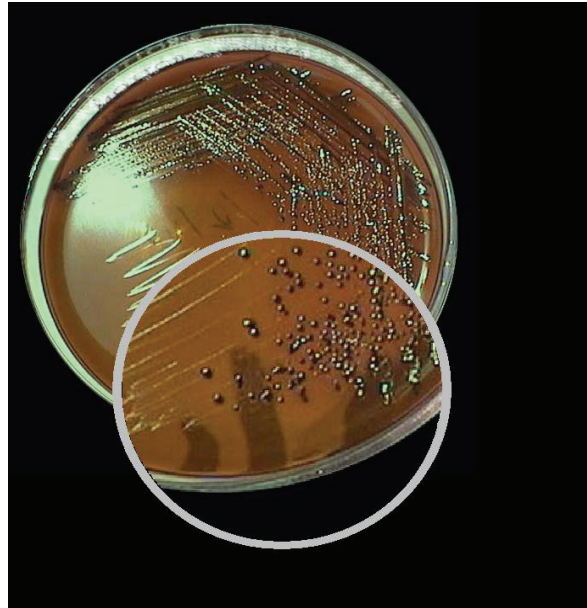


Abbildung 9: *Prevotella intermedia* in Kultur

Typische Kolonien (Abbildung 9) und Referenzstämme wurden anschließend in Schaedler-Bouillon mit sterilem Schafsblut (10:1) vermehrt. Hierbei handelt es sich um die Referenzstämme *P. nigrescens* (ATCC 25261) (Negativkontrolle), *P. intermedia* (ATCC 25611) und um fünf klinische Isolate (106, 120, BGH 3a, BHG 10 und M13). Der Stamm 120 wurde von einem Patienten mit aggressiver Parodontitis isoliert, während die anderen Isolate von Patienten mit chronischer Parodontitis stammten. Alle Patientenproben waren zuvor mittels PCR positiv auf Interpain A, B und C getestet worden.

Grundsätzlich erfordert der Nachweis einer enzymatischen Aktivität ein geeignetes Milieu zur Sicherstellung optimaler Verhältnisse bezüglich Temperatur, pH-Wert, Konzentration von Lösungsmittel und Detergenzien. Dies setzt die Herstellung eines den Eigenschaften der vermuteten Proteasen entsprechenden Puffers voraus.

Zunächst wurden die Bakteriensuspensionen in Schaedler-Bouillon und Schafsblut auf dem Schüttler ca. 15 Minuten vermischt, um eventuelle Sedimente vom Boden zu lösen und eine gewisse Homogenität zu erlangen. Danach wurde 1 ml jeder Suspension entnommen und 2 Minuten bei 10000 g

zentrifugiert. Sowohl Überstand als auch Sediment wurden zur Ermittlung der enzymatischen Aktivität verwendet.

Jeweils wurden vier Proben pro Sediment und Überstand jeden Stammes durch 15-minütige Inkubation in 0,1M Tris-HCl, pH 7,6, 5mM EDTA, 0,1mM NaCl, 2mM DTT und 0,02 M Tween 20 bei 37°C aktiviert. Die Zugabe von Tween 20 als Detergenz ist in diesem Fall unerlässlich, da es die Enzymaktivität dämpft, so dass eine zu erwartende zu frühe Interaktion mit der Kunststoffoberfläche der Mikrotiterplatten unterbleibt und so unter Testbedingungen trotz kleiner Mengen an Enzymen eine ausreichend nachweisbare Aktivität gewährleistet werden kann. Des Weiteren stellt es sicher, dass eventuell membrangebundene Proteasen solubilisiert werden und ihre Aktivität in Lösung getestet werden kann.

Nach Inkubation wurden verschiedene Substrate zu den Proben zugegeben, die mit Fluoreszenzmarker versehen waren, um eventuelle Interaktionen mit den Proteasen sichtbar zu machen. Hierzu wurde der Mikroplatten-Spektrofluorometer SpectraMax Gemini EM (Molecular Devices) verwendet.

Als Substrate dienten DQ Gelatin (Stammlösung 1mg/ml in Wasser, Arbeitskonzentration 10µg/ml in Puffer) zum gezielten Nachweis von Metallproteinasen, FTC-Caseine (Stammlösung 1mg/ml in Wasser, 10µg/ml in Puffer) zum Nachweis trypsin-ähnlicher Aktivität von Serinproteasen (Nachweis von Trypsin, Elastase, Chymotrypsin und weitere) sowie Boc-Val-Leu-Lys-AMC (Stammlösung 10nM in DMSO, Endkonzentration 100µM in DMSO) mit 10µM E64 (15 minütige Inkubation nach Zugabe bei 37°C) und ohne Inhibitor. Die Mikrotiterplatten wurden nach folgendem Schema befüllt und entsprechend den Einstellungen des Protokolls bis zu einem Wellenlängenmaximum von 595nm auf Aktivität getestet. Als Negativkontrolle diente steriles Wasser. Die einheitliche Füllmenge in den Depots betrug 200µl, die sich aus 5µl Probe, 185µl Puffer, zwischen 2µl und 5µl Substrat, eventuell 2µl Inhibitor, aufgefüllt auf 200µl mittels DMSO, zusammensetzte (Abbildung 10).

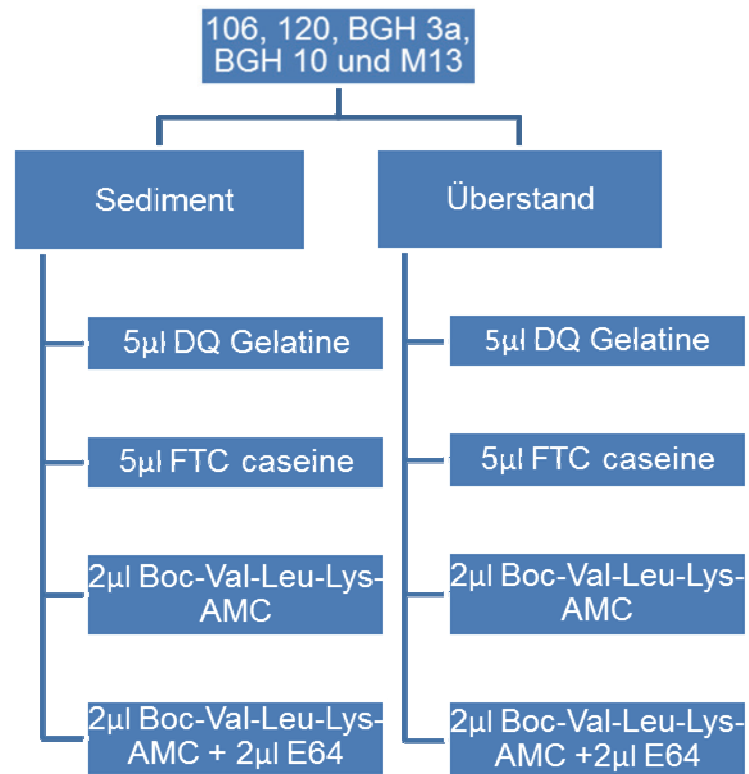


Abbildung 10: Versuchsablauf Aktivitätsbestimmung

5. Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse zur Keimquantifizierung, Protein- und Aktivitätsbestimmung vorgestellt.

5.1 Demographische Daten / Patientenpool

In die Studie wurden insgesamt 154 Personen, 139 Personen davon mit zuvor diagnostizierten parodontalen Erkrankungen, einbezogen. Anhand des klinischen Erscheinungsbildes ließ sich eine Einteilung in die Gruppe der aggressiven Parodontitis (AP) (41 Patienten), der chronischen Parodontitis (CP) (98 Patienten) und der Gruppe der parodontal Gesunden (15 Personen) vornehmen.

Der klinischen Klassifizierung lagen die entsprechenden Kardinalsymptome der jeweiligen Form der Parodontitis zugrunde, wobei man bei der CP vorwiegend auf Taschenbildung und/oder Rezessionen, generalisiertem horizontalem Attachementverlust, langsamer bis mäßiger Progression, Alterskollektiv ab dem 30. bis 35. Lebensjahr, Plaque und supra- bzw. subgingivaler Zahnstein und Blutung auf Sondierung als Parameter Wert legte.

Im Gegenzug galten rasch fortschreitende parodontale Gewebsdestruktion mit meist lokalisierten vertikalen Einbrüchen, keine bzw. geringe Entzündungszeichen der Gingiva, geringe Mengen an Plaque und supra- bzw. subgingivalem Zahnstein, Alterskollektiv vorwiegend < 35. Lebensjahr und eine eventuelle familiäre Häufung als klinische Zeichen einer AP.

Die Gewinnung der Plaque- sowie der Waschproben fand vor konventioneller SRP-Therapie und vor begleitender Antibiose statt.

5.2 Mikrobiologische Ergebnisse nach PCR-Verfahren

Zu Beginn der Studie stand der Nachweis von *P. intermedia* in subgingivalen Plaqueproben mittels PCR und konventioneller Auswertung über Gelelektrophorese.

Alle 154 Patientenproben wurden diesem Verfahren unterzogen. Von den insgesamt 154 Proben konnten 51 positiv auf *P. intermedia* getestet werden. Je nach Unterteilung ergab sich für die Patienten mit chronischer Parodontitis eine Prävalenz von 38%. 37 von 98 CP-Patienten konnten also positiv auf *P. intermedia* getestet werden. Patienten mit aggressiver Parodontitis wiesen eine Prävalenz von 34% auf, was bedeutet, dass 14 der getesteten 41 Patienten *P. intermedia*-positiv waren. Keiner der 15 Patienten der gesunden Kontrollgruppe hatte eine nachweisbare Menge an *P. intermedia* im gingivalen Sulcus (Abbildung 11, 12).

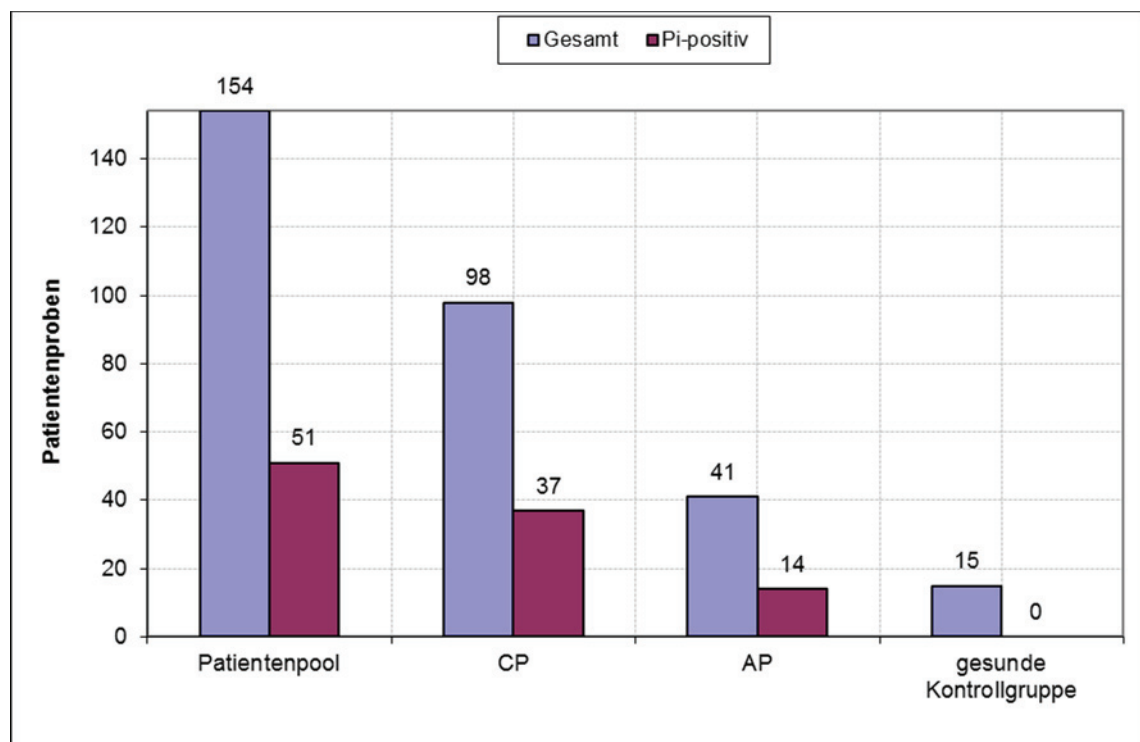


Abbildung 11: Einteilung der 154 Patienten in 98 chronische, 41 aggressive Parodontitis und 15 Gesunde einschließlich der *Prevotella intermedia*-positiven Proben

Die *P. intermedia* -positiven Proben wurden danach der quantitativen DNA-Analyse mittels Real-time-PCR unterzogen. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse. 24 von 37 *P. intermedia* -positiven Proben von Patienten mit chronischer Parodontitis wiesen eine Keimzahl $\geq 10^6$ Zellen pro Probe auf. Bei den *P. intermedia*-positiven Proben von Patienten mit aggressiver Parodontitis verhielt es sich ähnlich. Hier wurde bei fünf von 14 Proben ein High Load von $\geq 10^6$ detektiert (Tabelle 4). Die zur Kontrolle mitanalysierten Proben von Patienten mit gesundem Parodont zeigen, wie erwartet, keine Prävalenz von *P. intermedia*.

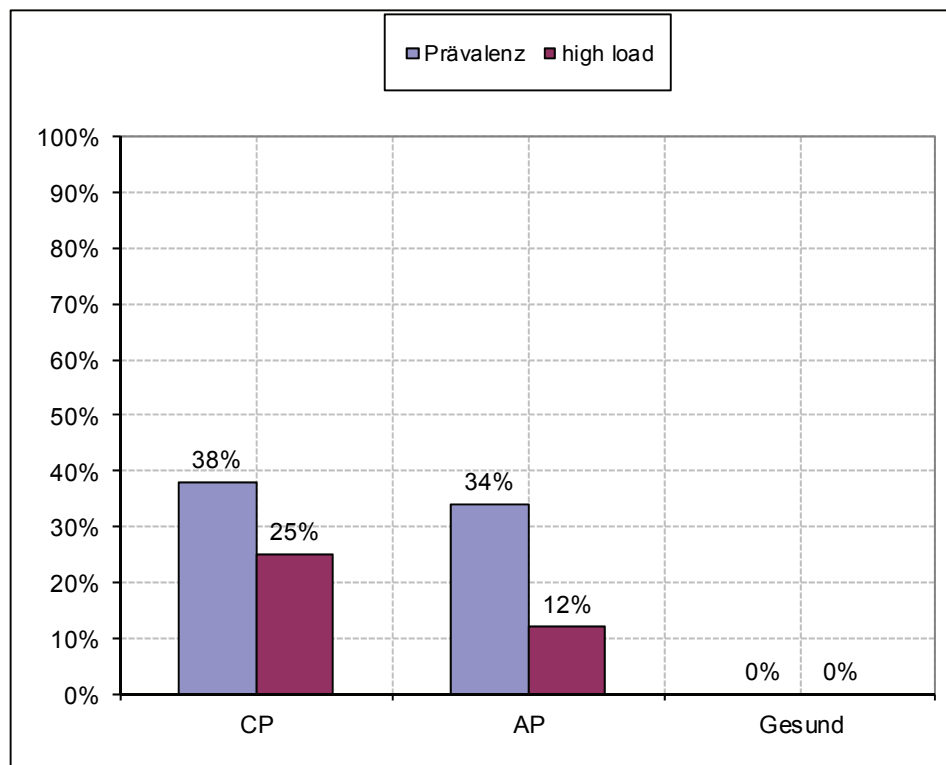


Abbildung 12: Prävalenz von *P. intermedia* bei chronischer Parodontitis (CP), aggressiver Parodontitis (AP) und gesundem Parodont.

37 (38%) von 98 CP-Proben waren *P. intermedia* -positiv, 24 (25%) davon mit einer Keimzahl $\geq 10^6$; 14 (34%) von 41 AP, 12% Keimzahl $\geq 10^6$; kein *P. intermedia* im gesunden Parodont nachweisbar

Tabelle 4: Prävalenz von *P. intermedia*

Gruppe	Prävalenz	High Load ($\geq 10^6$)
--------	-----------	---------------------------

Gesunde (15)	0	0
aggressive Parodontitis (41)	14 (34%)	5 (12%)
chronische Parodontitis (98)	37 (38%)	24 (25%)

Ausgehend von allen *P. intermedia* -positiven Proben wurden, nach Bestimmung der entsprechenden Primer, PCRs zum Nachweis der Proteasegene von Interpain A, Interpain B und Interpain C, den Cysteinproteasen von *P. intermedia*, durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass Interpain A bei 41 (80%) der insgesamt 51 *P. intermedia* -positiven Proben vorkam. Interpain B konnte in 47 Fällen (92%) detektiert werden. Interpain C wurde 48-mal, also in 94% der Fälle nachgewiesen (Abbildung 13, Tabelle 5).

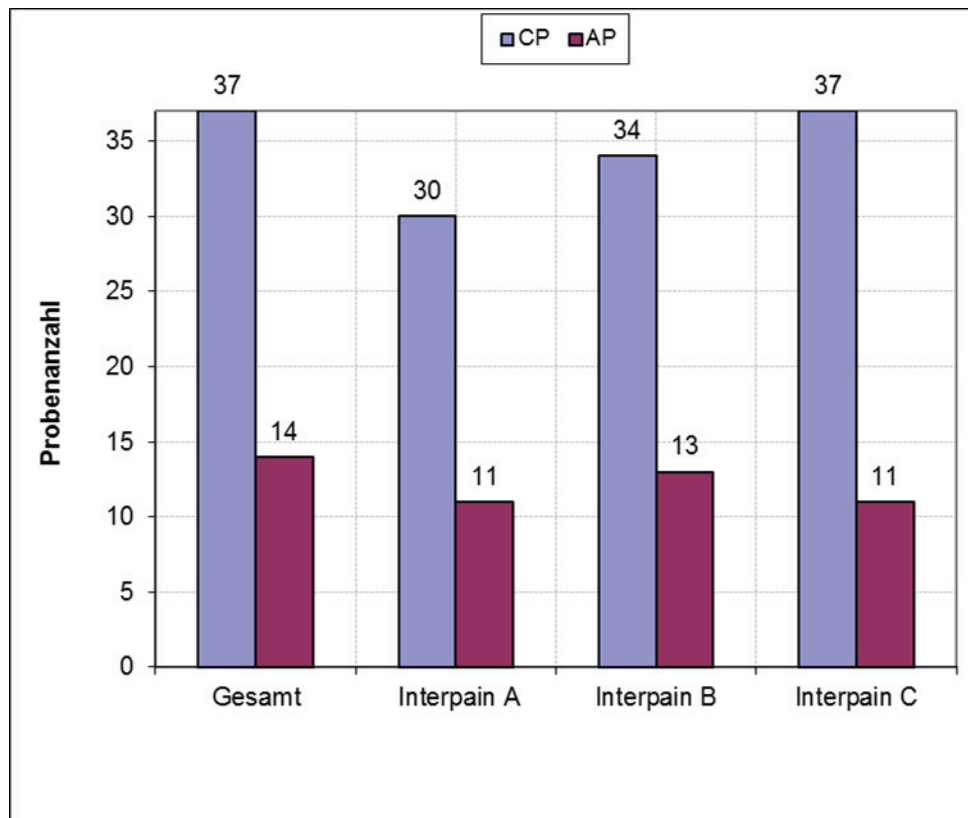


Abbildung 13: Nachweis der Proteasegene von Interpain A, Interpain B und Interpain C ausgehend von der Gesamtzahl von den auf *P. intermedia* -Stamm-DNA getesteten Positivproben chronischer und aggressiver Parodontitis

Tabelle 5: Nachweis der Proteasegene in *P. intermedia* -positiven Proben

<i>P. intermedia</i>	Interpain A	Interpain B	Interpain C
51	41	47	48

100%	80%	92%	94%
------	-----	-----	-----

Werden Proben mit aggressiver und chronischer Parodontitis differenziert analysiert, so zeigte sich der deutlichste Unterschied in Bezug auf den Nachweis der einzelnen Proteasegene bei Interpain C. Interpain A wurde bei 81% der chronischen sowie 79% der aggressiven Proben detektiert. Die prozentuale Differenz von 2% ist verschwindend gering. Das trifft auch auf Interpain B zu. Dies ist in 92% der Fälle bei chronischer sowie 93% der Fälle bei aggressiver Parodontitis nachweisbar. Der Unterschied von 21% zwischen chronischer und aggressiver Parodontitis bei Interpain C ist demgegenüber deutlich größer. Interpain C wurde in allen 37 (100%) *P. intermedia* -positiven CP-Proben nachgewiesen, jedoch ließ es sich nur in 11 (79%) der 14 AP-Proben detektieren. Dieser Sachverhalt wird mit den Abbildungen 13 und 14 grafisch verdeutlicht.

Abbildung 15 zeigt ein Agarosegel aus den Versuchen des Interpain B-Nachweises.

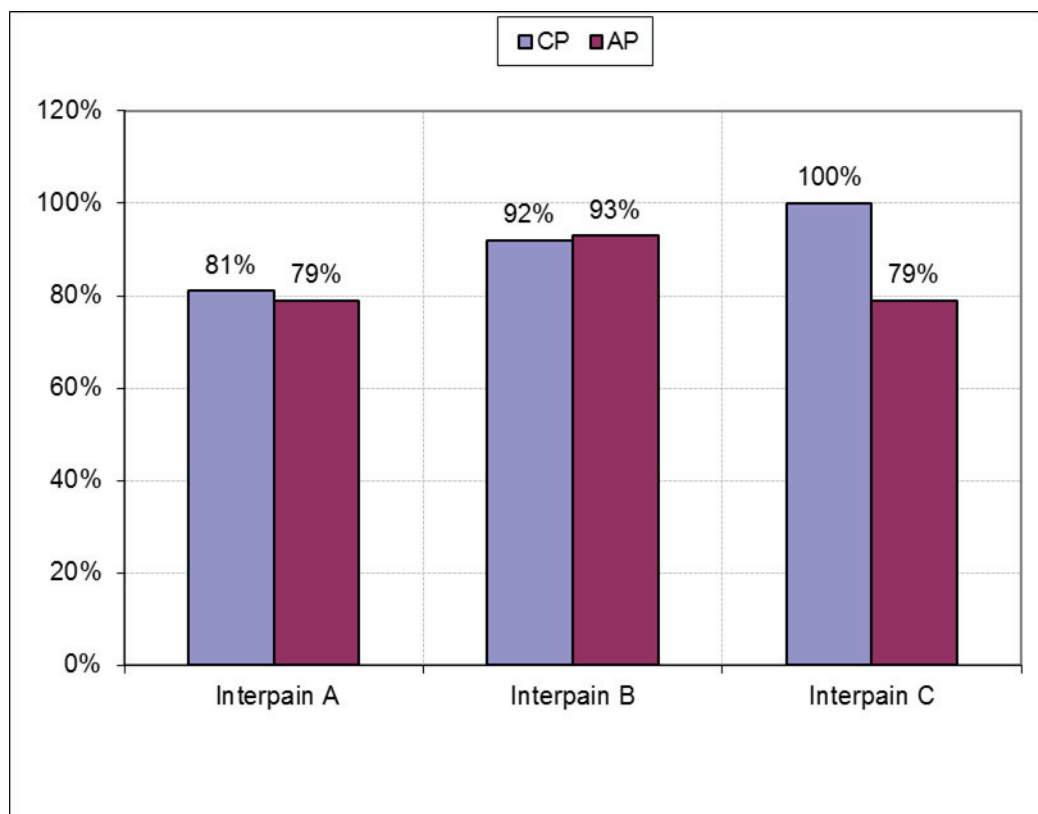


Abbildung 14: Prozentuale Darstellung der einzelnen Proteasegennachweise für Interpain A, B und C in Proben chronischer und aggressiver Parodontitis

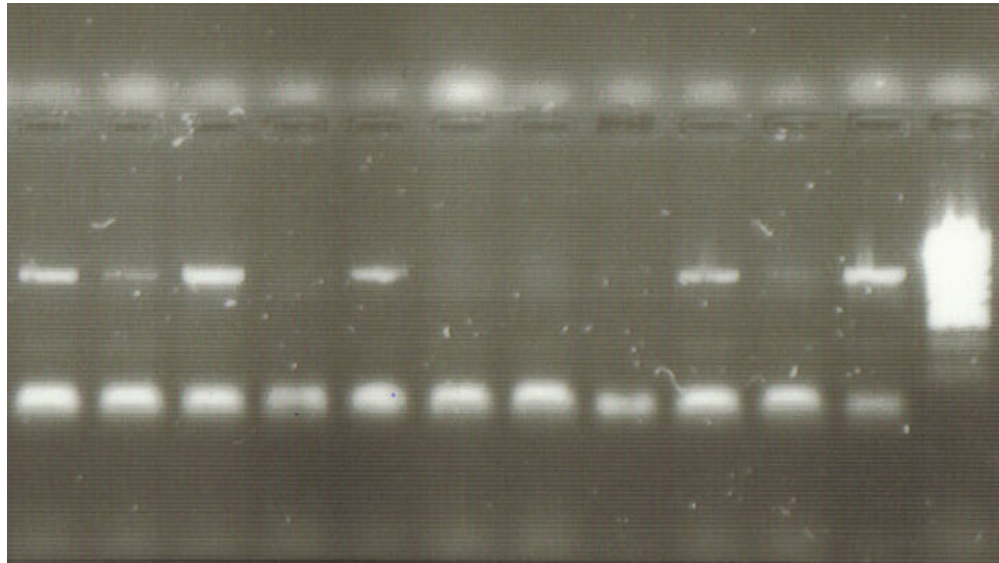


Abbildung 15: Elektrophoresegel nach Sichtbarmachen der zu detektierenden Gene mittels Fluoreszenzfarbstoff; Nachweis von Interpain B aus den *P. intermedia* - positiven Proben

5.3 Western Blot – Nachweis der Interpaine im Gingivafluid

Ziel der Western Blot-Versuchsreihe war es, das Protein von Interpain A zu detektieren.

Aus verschiedenen Studien der Jagiellonian-Universität Krakau geht hervor, dass die katalytische Domäne von Interpainen durch die Anwesenheit von E64 in ihrer Funktion gehemmt wird und deshalb in ihrer inaktiven Form nicht mehr mittels Western Blot detektiert werden kann.

Vor dem eigentlichen Western Blot-Verfahren wurde der Versuch unternommen, mittels Dot Blot die passende Proteinmenge und dazugehörige Antikörper I und II – Konzentration zu ermitteln.

Zur Versuchsreihe wurden Waschproben der BGH-Reihe herangezogen (10 Patienten mit chronischer Parodontitis). Diese bestand aus jeweils 3 Proben pro Patient aus verschiedenen tiefen Taschen, aufsteigend gekennzeichnet mit a, b, c.

Die Proben 1 b und c, 2 a, b und c, 3a, 4 a und c, 5 c, 6 b und c sowie Probe 10 erwiesen sich als positiv und wurden für den weiteren Versuchsverlauf eingesetzt.

Mit diesen Proben erfolgte nun eine Reihe von Versuchen, die Proteinsuspensionen aus dem Sulkus elektrophoretisch aufzuspalten, diese vom Trenngel auf die entsprechende Trägermembran zu übertragen und mittels Chemilumineszenz nachweisbar zu machen. Der Proteintransfer sowie die zuvor erfolgte Auftrennung der Suspensionen stellten nicht das Problem dar.

Dem Protokoll entsprechend liefen mehrere Blots derselben Probe mit unterschiedlichen Konzentrationen von 1µl bis 10µl Probe. In allen Fällen waren nach Ponceau-Rot-Färbung unspezifische Proteinbanden auf der PVDF-Membran nachweisbar.

Leider war es schwierig, nach Inkubation mit den beiden Antikörper-Lösungen positive Ergebnisse in Bezug auf Interpain A zu erzielen. Nur andeutungsweise konnten Banden detektiert werden (Abbildung 16).

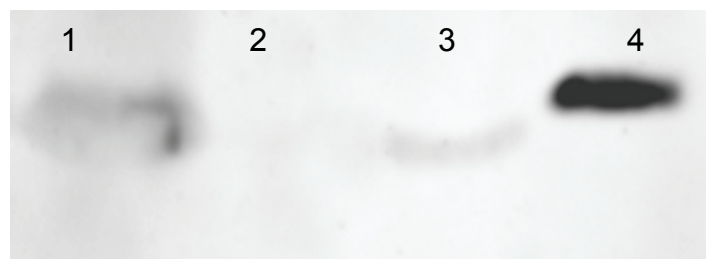


Abbildung 16: Western Blot zum Nachweis von Interpain A
1-3 *P. intermedia* positive Patientenproben, 4 Positivkontrolle

5.4 Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung

Ziel war die Darstellung von zweierlei Ergebnissen nach dem Versuch der Aktivitätsbestimmung.

Zum einen galt es, eine enzymatische Aktivität auf verschiedene zugesetzte Substrate zu ermitteln. Hierzu wurden aus vorangegangenen Versuchen positiv

auf *P. intermedia* getestete Kulturen herangezogen. Als Substrate dienten FTC Casein, DQ Gelatin und Boc-Val-Leu-Lys-AMC.

Zum anderen ließ sich bei entsprechender Versuchsdurchführung noch ermitteln, ob eine membrangebundene enzymatische Aktivität vorherrscht, oder die Enzyme aktiv vom Bakterium sezerniert werden.

Wie bereits erläutert, wurden nach Zentrifugation Sediment und Überstand derselben Kultur auf ihre Aktivität in Verbindung mit spezifischen Substraten für Serin-, Metall- und Cysteinproteaseaktivität getestet. Nach Substratzugabe und Inkubation erfolgte die Aktivitätsbestimmung via Fluoreszenzmethode anhand definierter Standards.

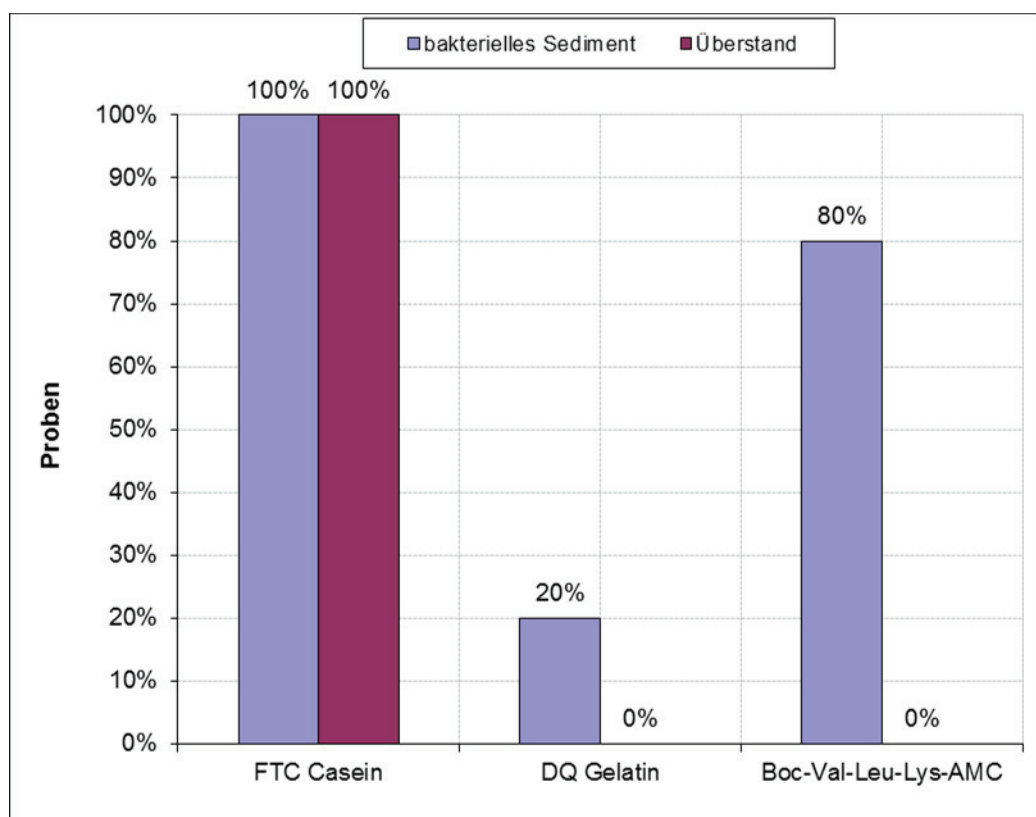
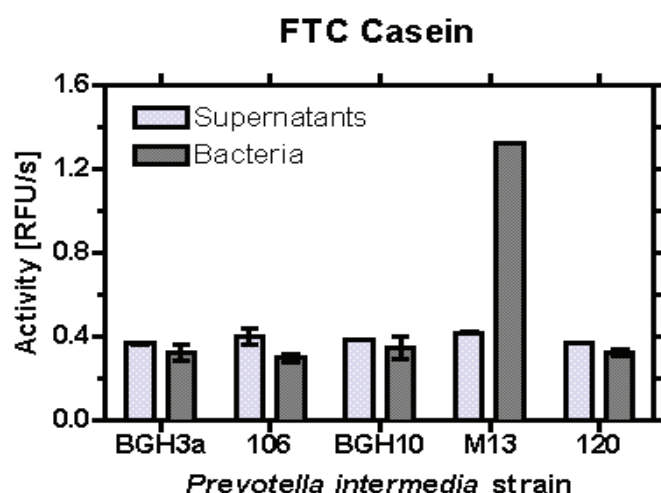


Abbildung 17: Darstellung der enzymatischen Aktivitäten im Sediment und im Überstand in Abhängigkeit vom zugeführten Substrat

In Abbildung 17 wird deutlich, dass eine enzymatische Aktivität nach Zugabe von FTC Casein, welches als Substrat spezifisch mit Serinproteasen reagiert,

bei 100% der getesteten Kulturen sowohl im Überstand als auch im bakteriellen Sediment nachweisbar war. Im Gegenzug hierzu stand die fehlende Aktivität im Überstand der Proben mit DQ Gelatin und Boc-Val-Leu-Lys-AMC als zugeführtes Substrat. Auch konnte nur in 1 von 5 (20%) mehrmals getesteten Kulturen wiederholt eine Metallproteasen-Aktivität im bakteriellen Sediment mittels DQ Gelatin detektiert werden. 4 (80%) der Proben zeigten Substratumsatz mit Boc-Val-Leu-Lys-AMC im Sediment. Die Quantität des Substratumsatzes wurde in dieser Darstellung nicht beachtet.

Die folgenden Abbildungen veranschaulichen die Sensibilität der getesteten Kulturen in Bezug auf die Zufuhr spezifischen Substrats.

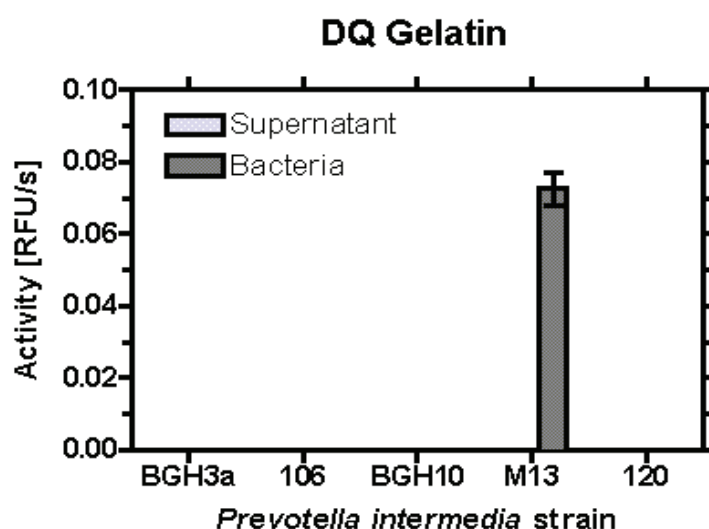


Prevotella intermedia strain	Supernatants		Bacteria	
	Y1	Y2	Y1	Y2
BGH3a	0.370	0.360	0.351	0.293
106	0.434	0.356	0.308	0.282
BGH10	0.379	0.380	0.385	0.308
M13	0.419	0.414	1.320	1.317
120	0.370	0.369	0.333	0.309

Abbildung 18: Serinproteasen-Aktivität im bakteriellen Sediment und im Überstand nach Zufuhr von FTC Casein zu den entsprechenden Kulturen

Schlussfolgernd aus Abbildung 18 ist festzuhalten, dass eine Serinproteasen-Aktivität in allen Proben nachgewiesen werden konnte, wobei diese bei 4 von 5 Proben im Sediment wie im Überstand ähnlich hoch war. Nur bei Stamm 13 wurde eine deutlich höhere Aktivität im bakteriellen Sediment detektiert.

Gänzlich anders verhielten sich die Ergebnisse nach Zugabe von DQ Gelatin als Substrat. Lediglich bei Stamm 13 konnte Metallproteasen-Aktivität aufgezeigt werden. Diese beschränkte sich auf das bakterielle Sediment. Keine Reaktion nach Inkubation zeigte der Überstand (Abbildung 19).



Prevotella intermedia strain	Supernatant		Bacteria	
	Y1	Y2	Y1	Y2
BGH3a	-0.017	-0.013	-0.027	-0.016
106	-0.014	-0.015	-0.016	-0.021
BGH10	-0.011	-0.009	-0.014	-0.021
M13	-0.007	0.000	0.077	0.068
120	-0.003	-0.007	-0.017	-0.026

Abbildung 19: Metallproteasen-Aktivität im bakteriellen Sediment des Stamms 13 nach Zufuhr von DQ Gelatin zu den entsprechenden Kulturen

Stamm 13, bei dem in den ersten beiden Versuchen immer die deutlichste Aktivität im bakteriellen Sediment auf das jeweilige Substrat nachgewiesen werden konnte, zeigte im folgenden Versuch mit Boc-Val-Leu-Lys-AMC ohne Inhibitor eine sehr geringe und bei Zugabe von Boc-Val-Leu-Lys-AMC + E64 gar keine Aktivität (Abbildung 20).

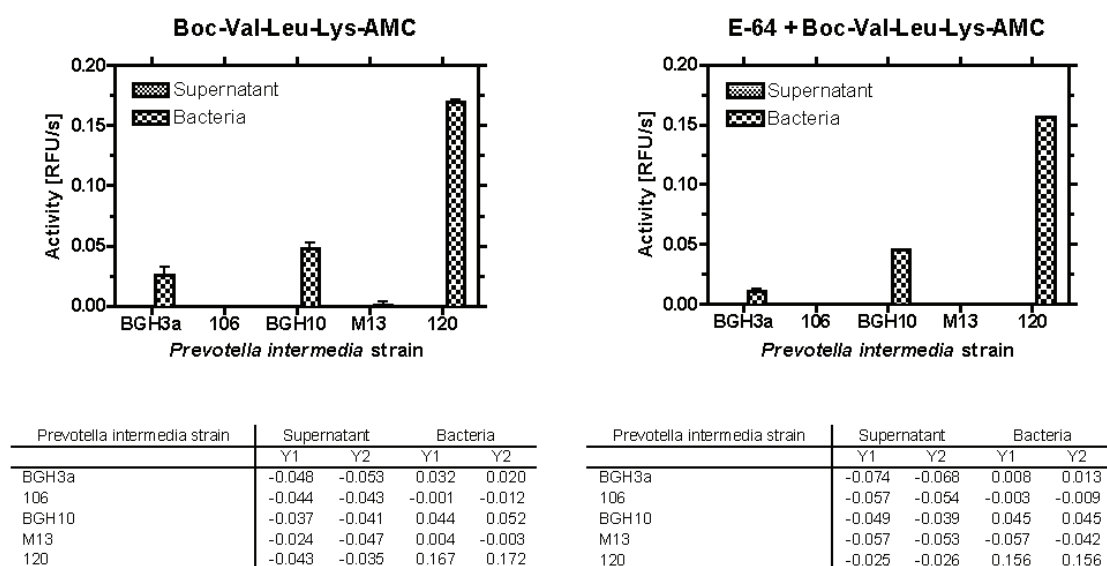


Abbildung 20: Cysteinproteasen-Aktivitäten im bakteriellen Sediment der Stämme BGH 3a, BGH 10, M13 und 120 vor und nach Inkubation mit dem Cysteinprotease-spezifischen Inhibitor E64

Auch wies der Überstand keinerlei enzymatische Aktivität auf. Der Stamm 120 schien in Bezug auf die Cysteinproteasen-Aktivität des Bakteriums die höchste Affinität zum Substrat zu besitzen, was in der Abbildung 20 durch den höchsten Umsatzwert mit einer Spitze von 0,172 RFU/s ohne und 0,156 RFU/s mit Inhibitor verdeutlicht wird. Im direkten Vergleich der beiden Diagramme und Tabellen ist festzustellen, dass sich nach Inkubation mit dem Inhibitor E64 die Aktivität, gemessen in RFU/s, im rechten Bild zwar nicht deutlich, aber in jedem Fall reduziert darstellt.

Im Allgemeinen konnte also beim Versuch der Aktivitätsbestimmung eine hohe proteolytische Aktivität bei *P. intermedia* nachgewiesen werden.

Eine Interpain A-spezifische, also eine Cysteinprotease-Aktivität war lediglich bei einem Stamm in nennbarer Form nachweisbar, 2 weitere Stämme reagierten schwach.

Die Proteolyse von Boc-Val-Leu-Lys-AMC reagierte sensibel auf E64, dem Cysteinproteasehemmer.

6. Diskussion

6.1 Prävalenz im gingivalen Sulkus / Gennachweis Cysteinproteasen

Hauptanliegen der Studie war die Ermittlung der Prävalenz von *P. intermedia* im gingivalen Sulkus sowie die Detektion der Gene für die drei Cysteinproteasen Interpain A, B und C. Ein kulturunabhängiges Nachweisverfahren sollte die Grundlage dieser Versuchsreihe darstellen.

Dies erfolgte mittels konventioneller PCR-Verfahren, welche anhand eines exakten PCR-Protokolls realisiert wurden. Die entsprechenden Temperaturen und Zeiten der Zyklen fanden in leichter Abwandlung schon in Studien von Eick und Pfister (2002) Verwendung, was für eine Evidenzbasierung und Reproduzierbarkeit der Studie spricht.

Die entsprechenden Primer für *P. intermedia* sowie für die Proteasen Interpain A, Interpain B und Interpain C basierten auf der Studie von Ashimoto et al. (1995) bzw. wurden von der Oral Pathogen Sequence Database designet.

Als Positivprobe zur Verifizierung der Nachweisreihen diente der Laborstamm *P. intermedia* ATCC 25611.

P. intermedia gehört zu den parodontopathogenen Bakterienspezies des „Orangen Komplex“. Somit zählt sie, wie die anderen Vertreter dieser Gruppierung, zu den Brückenkeimen. Sie steht in engem Kontakt zum „Roten Komplex“ und tritt häufiger mit zunehmender Sondierungstiefe auf (Socransky et al. 1998). In diesem Zusammenhang lassen sich die mikrobiologischen Ergebnisse aus den PCR-Verfahren zum Nachweis von *P. intermedia* im gingivalen Sulkus nachvollziehbar darstellen.

P. intermedia wurde im Sulkus an chronischer und aggressiver Parodontitis erkrankter Probanden nachgewiesen.

Kein Nachweis gelang hingegen in der gesunden Kontrollgruppe. Die Abwesenheit von *P. intermedia* im Sulkus parodontal Gesunder wurde auch schon in der Studie von Mitsugi Okada et al. (2001) dargestellt, in der Kinder der Altersklasse 2 bis 12 auf die Prävalenz von *P. intermedia* getestet wurden.

Ausgehend davon, dass im klinischen Bild der Gesunden keine pathologisch tiefen Taschen auftreten, so sind unsere Ergebnisse in Übereinstimmung mit anderen, welche belegen, dass das Auftreten von *P. intermedia* mit entsprechenden Taschentiefen assoziiert ist (Socransky et al. 1991).

Im Allgemeinen lässt sich also belegen, dass ein Vorkommen an *P. intermedia* mit einer klinisch nachweisbaren Erkrankung des Zahnhalteapparates assoziiert ist, was auch schon Van Winkelhoff et al. (2002) in einer Studie belegte.

Mit einer Prävalenz von 38% bei Patienten mit chronischer Parodontitis und 34% bei Patienten mit aggressiver Parodontitis ist eine klare Spezifizierung des Keimes auf ein klinisches Krankheitsbild nicht möglich. In einer Studie von Hamlet et al. (2001) über die Prävalenz von Parodontalkeimen innerhalb einer australischen Population variierte die Prävalenz zwischen 10,5% und 41,7% je nach Altersgruppe, aber ebenfalls unabhängig von der klinischen Form der Parodontitis.

Einzig in Bezug auf die Keimzahl (High Load ($\geq 10^6$)) erscheint eine gewisse Unterscheidung zwischen chronischer und aggressiver Parodontitis möglich.

Mit einem High Load bei 12% der Proben liegen die Keimzahlen bei Patienten mit aggressiver Parodontitis deutlich unter dem Wert der an chronischer Parodontitis erkrankten Individuen, bei denen 25% eine erhöhte Keimzahl im Sulkus aufwiesen. Erklärbar wird dies eventuell durch den Pathomechanismus der beiden Pathogenitätsformen. Das klinische Bild einer aggressiven Form der Parodontitis ist unter anderem durch den raschen, lokalen Attachmentverlust geprägt. Der subgingivale Biofilm ist nicht vollends strukturiert oder fehlt ganz (DGP 2010). Optimale Voraussetzung für *P. intermedia* als obligat anaerobes Stäbchenbakterium ist jedoch eine weitgehend organisierte Plaque mit anaero-

ben Verhältnissen, wodurch *P. intermedia* als Spätbesiedler eher bei Patienten mit chronischer, langsam fortschreitender Parodontitis in hohen Konzentrationen auffindbar ist. Dies könnte eine mögliche Erklärung für das Ergebnis unserer Studie darstellen.

Die Ergebnisse des Gennachweises der drei bekannten Cysteinproteasen von *P. intermedia* bestätigen die Vermutung, dass diese Proteasen einen wichtigen Virulenzfaktor für das Bakterium darstellen. Bei 80% aller *P. intermedia* - positiven Proben ließ sich Interpain A, bei 92% Interpain B und zu 94 % Interpain C detektieren. Bei differenzierter Betrachtung von Proben aggressiver und chronischer Parodontitiden ließen sich ähnlich hohe Prozentsätze für alle drei Interpaine ermitteln. Interpain C war in 100% der Patientenproben mit chronischer Parodontitis nachweisbar. Somit lässt sich vermuten, dass Interpain C wohl bedeutend die Pathogenese der chronischen Parodontitis mitbestimmt. Dies stellt jedoch eine Hypothese dar, zu deren Verifizierung es weitere Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Cysteinproteaseaktivität von *P. intermedia* bedarf.

6.2 Western Blot – Nachweis der Interpaine im Gingivafluid

Im Versuch Interpain A als natives Protein im Sulkus an chronischer Parodontitis erkrankter Probanden nachzuweisen konnten keine positiven Ergebnisse erzielt werden.

Dem Protokoll entsprechend liefen mehrere Blots derselben Probe mit unterschiedlichen Konzentrationen von 1µl bis 10µl Enzymlösung, aber jeweils einem Gesamtvolumen von 20µl (siehe Tabelle 4), wobei in allen Fällen nach Ponceau-Rot-Färbung unspezifische Proteinbanden auf der PVDF-Membran nachweisbar waren. Leider konnten im Anschluss, nach Inkubation mit den beiden Antikörper-Lösungen in spezifischer Konzentration, keine Ergebnisse erzielt werden, es gab also keine spezifische Bindung an Interpain A.

Bis hin zur elektrophoretischen Spaltung verlief der Versuch also demzufolge fehlerfrei. Die Trennung der unspezifischen Proteinsuspension aus den Waschproben stellte kein Problem dar.

Trotz vorab mittels Dot Blot ermittelter Antikörperkonzentrationen gestaltete sich der Interpain A Nachweis als äußerst kompliziert.

Tatsache ist, dass zwar im Dot Blot der Antikörper I an Interpain A erfolgreich binden konnte, im Western Blot nach Elektrophorese diese Bindung jedoch nicht mehr zu Stande kam.

Grund hierfür ist wahrscheinlich die zu geringe Menge an Protein Interpain A in den einzelnen getesteten Waschproben. Es lässt also schließen, dass der Antikörper gegen Interpain A immer noch zu wenig sensitiv reagiert, um sehr geringe Proteinmengen nach elektrophoretischer Spaltung zu detektieren, wohingegen konzentrierte Proteingemische kein Problem darstellen.

Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung für Boc-Val-Leu-Lys-AMC als Substrat bekräftigt. Bei den Proben BGH 3a und BGH 10 gelang eine Kultivierung. Diese Stämme zeigten im anschließenden Nachweis der Proteaseaktivität zwar nur geringe Fluoreszenz, was aber für eine nachweisbare, aber niedrige Proteaseaktivität spricht.

Es ist davon auszugehen, dass die Keimkonzentration in den Kulturproben deutlich höher als im gingivalen Sulkus war. Die gemessene geringe Proteaseaktivität lässt auch absolut auf eine geringere Menge an Interpain A schließen. Somit erscheint das Ergebnis aus dem Blotting plausibel. Dies bedeutet auch, dass die Nachweismethode einer proteolytischen Aktivität eines Proteins sensitiver ist als der Proteinnachweis mittels Western Blot selbst.

6.3 Aktivitätsbestimmung – Nachweis der Proteaseaktivität

Der destruktive Prozess des Attachmentverlusts beruht auf der komplexen Interaktion zwischen den parodontopathogenen Bakterien, dem Immunsystem

des erkrankten Individuums und den entzündlichen Prozessen (Haffajee und Socransky 1994).

Seinen Einfluss hierauf nimmt *P. intermedia* durch die Produktion gewebsmodellierender Proteasen, wobei in diesem Versuch drei Proteaseaktivitäten klar diesem Bakterium zugeordnet werden konnten.

Von proteolytischen Enzymen ist bekannt, dass sie zwar begrenzt bei entsprechend proteolytisch aktiven Bakterienspezies vorkommen, dennoch aber eine relativ ausgedehnte Substratspezifität aufweisen. Dieses Wissen um die Substratspezifität stellte die Grundlage dar, die proteolytische Aktivität lebender Kulturen von *P. intermedia* zu testen.

Aus unseren vorangegangenen Versuchen ging hervor, dass zumindest genetisch ein Nachweis von drei Cysteinproteasen, den Interpainen, gelang.

Als spezifisches Enzym zum Cysteinproteasenachweis diene uns Boc-Val-Leu-Lys-AMC. Dessen Proteolyse führte auf Grund von Fluoreszenzmarkierung zu einer mittels Fluorometer messbaren Cystein-proteolytischen Aktivität.

Cysteinproteasen sind eine Gruppe von Enzymen, die zu den Hydrolasen gezählt werden. Ihr Charakteristikum stellt die katalytische Diade, bestehend aus den Aminosäuren Cystein und Histidin, dar.

Interpain A ist solch eine Cysteinprotease der Histidin-Diade-Klasse, die mit Streptopain/streptococcal pyrogenic exotoxin B (SpeB), einem Exotoxin des strikt humanpathogenen Bakteriums *Streptococcus pyogenes*, welches bevorzugt den Pharynx und die Haut besiedelt, der Gruppe der parodontopathogenen Enzyme der katalytischen Diade zugerechnet wird. Es wird als Proenzym (Zymogen) sezerniert, was bedeutet, dass es erst im Zusammenspiel mit anderen Proteasen, Enzymen oder chemischen Verbindungen in die aktive Form überführt wird.

Strukturell ist Interpain A ein Protein, welches eine gestreckte Form mit einer Prodomäne mit N-Terminus und einer C-terminalen papain-ähnlichen Cystein-

protease-Domäne enthält, welche gabelförmig in eine rechte und eine linke Subdomäne zu unterteilen ist. Der N-terminale Part vermittelt den Kontakt mit einem Substrat, während die anschließende Bindung mit der Cysteinprotease-Domäne die Aufschlüsselung des Moleküls bedeutet. Nur die genaue räumliche Ausrichtung beider, der linken Subdomäne mit der katalytische Cystein-Aminosäure und der rechten katalytischen Histidin-Subdomäne, setzt die Proteolyse in Gang (Mallorqui-Fernandez et al. 2008).

Dies spricht auch für die Substratspezifität der Interpaine.

Für Interpain A wurde in Studien von Potempa et al. (2009) belegt, dass das Protein C3 des Komplementsystems eines dieser spezifischen Substrate darstellt.

Das Komplementsystem ist ein Teil des unspezifischen humoralen Immunsystems, welches zur Elimination von zellulären Antigenen beiträgt. Die Hauptaufgaben liegen also in der Erkennung, dem Erkennbarmachen für Phagozyten (Opsonisierung) und der Zerstörung von Mikroorganismen. Es gibt drei Wege der Aktivierung des Komplements, vom über Antikörper vermittelten klassischen Weg, über den Mannose-bindendes Lektin aktivierten Lektin-Weg, bis hin zum spontanen und Antikörper-unabhängigen alternativen Weg, welche alle drei in der Opsonisierung der Zelloberfläche des Pathogens mit C3b, der aktivierten Form von C3, einer der neun Bestandteile der Komplementfaktoren, enden. Es folgt die Formierung des Membranangriffskomplexes (MAC) und die Lyse der Zelle.

P. intermedia hat nun mittels Interpain A die Möglichkeit sich vor dieser Kaskade der Zellzerstörung, ausgehend vom wirtseigenen Immunsystem, zu schützen, indem es das Schlüsselprotein für alle drei Aktivierungswege des Komplementsystems inhibiert. Dies wurde durch Studien an der Jagiellonian-Universität Krakau belegt. Man fand heraus, dass Interpain A bevorzugt die α -Ketten von C3 spaltet. Hierzu wurde das Protein C3 mittels SDS-Page in seine zwei Peptidketten, α - und β - Kette, gespalten und mit Interpain A versetzt, wobei fast ausschließlich die α -Kette attackiert wurde und sich die β -Kette als re-

sistent erwies. Dies geschah konzentrationsabhängig, wobei mit steigender Konzentration an Interpain A auch die Proteolyseaktivität stieg. Durch diesen Mechanismus hat *P. intermedia* die Möglichkeit die bakterizide Aktivität der Sulkusflüssigkeit herabzusetzen und subgingivales bakterielles Wachstum und deren Kolonisation zu forcieren (Potempa et al. 2009).

Eine weitere Möglichkeit die Wirtsabwehr regulierend zu beeinflussen wurde von Jansen, Grenier et al. (1995) dargestellt.

Dies geschieht über den Abbau von Immunglobulinen, speziell IgG. Zu dieser Schlussfolgerung gelangten sie, als sie proteolytische Aktivität verschiedener *P. intermedia* -Stämme in Bezug auf die IgG nachwiesen. Um zu belegen, dass es sich um eine Cysteinproteasenaktivität handelte, wurden Versuchsreihen gestartet, bei denen die proteolytischen Stämme mit Cysteinproteasehemmer (Iodoacetamine und E64) versetzt wurden, wodurch die IgG-proteolytische Aktivität zum Erliegen kam.

Es stellte sich heraus, dass die *P. intermedia* -Stämme mehrere Proteasen besitzen, die unspezifisch IgG spalten. Diese Proteaseaktivität fand sich membrangebunden (Jansen et al. 1995).

Des Weiteren zeigte sich, dass trotz Annahme, dass die Gattung Prevotella zu den saccharolytischen oralen Mikroorganismen gehört, die proteolytische Zersetzung von Immunglobulinen in Aminosäuren und Peptide das Wachstum der Stämme fördert, was impliziert, dass diese Fragmente als Nährstoffe vom Bakterium verstoffwechselt werden können (Jansen et al. 1995).

Für die Bindung an das IgG ist ein 65-kD-Oberflächenprotein, ein Fc-Rezeptor, mit Bindungsaktivität gegen die Fc-Domäne des IgG-Moleküls beschrieben (Labbé und Grenier, 1995).

Die Gefäßpermeabilitätssteigerung durch die Anwesenheit von *P. intermedia* im Sulkus wird zwar diskutiert, wurde aber noch nicht abschließend belegt. Bekannt ist jedoch ein Modell von Imura et al. (1994), was die permeabilitätsstei-

gernde Wirkung von Cysteinproteasen am Beispiel von RgpA, einer arginin-spezifischen Cysteinprotease von *P. gingivalis*, bestätigt.

Dies wurde anhand von einem Modell, basierend auf dem Kinin-Kallikrein-System, erklärt. Hier wird diskutiert, dass Plasmapräkallikrein, welches sonst im Zuge der Sofortreaktion einer Entzündung durch den aktivierten Hagemann-Faktor in das aktive Kallikrein konvertiert wird, nun durch die arginin-spezifische Cysteinprotease RgpA von *P. gingivalis* aktiviert wird. (Imura et al. 1994)

Diese Enzyme im Komplex spalten dann High-Molekular-Weight Kininogen in den eigentlichen, für die Vasodilatation und die Permeabilitätssteigerung verantwortlichen Effektor, das Peptid Bradykinin.

Ähnlichkeiten in der Wirkung der Cysteinprotease Interpain A im Vergleich zu den Cysteinproteasen von *P. gingivalis* können vermutet werden.

Bedenkt man die breit gefächerte Wirkungsweise von Cysteinproteasen im Sulkus, ist es nicht verwunderlich, dass in unserem Versuch eine erkennbare Reaktion auf das fluoreszenzmarkierte Substrat in 3 von 5 klinischen Kulturen nachgewiesen werden konnte. Ähnlich wie bei Jansen et al. (1995) wurde entschieden, die gezeigte Aktivität als eine cysteinspezifische amidolytische Aktivität zu verifizieren, da nach Inkubation mit E64, einem Cysteinproteaseinhibitors, die Aktivität gemessen in RFU/s sank. Die Proteolyse von Boc-Val-Leu-Lys-AMC reagierte sensibel auf die Zugabe von E64.

Nur das bakterielle Sediment wies eine Reaktion nach Inkubation mit dem Substrat auf, nicht der Überstand. Somit handelt es sich um eine bakterienzellassoziierte Aktivität, die nicht vom Bakterium freigesetzt wird. Auch hier findet sich Übereinstimmung zu der Versuchsreihe von Jansen et al. (1995), der ebenso wie wir eine membrangebundene, bakterienzellassoziierte Aktivität vermerkte. Interessant erscheint jedoch, dass die deutlichste Reaktion nach Substratzufuhr ausgerechnet der Stamm 120 aufzeigte, der ein Isolat aus dem Sulkus eines an aggressiver Parodontitis erkrankten Patienten darstellte.

Es lässt sich schlussfolgern, dass *P. intermedia* zwar häufiger und in höheren Keimzahlen bei Patienten mit chronischer Parodontitis auftritt, aber die Cysteinproteaseaktivität bei Patienten mit aggressiver Parodontitis stärker ausfällt, was eventuell das klinische Bild eines aggressiveren, forcierten Knochenabbaus mit beeinflusst.

Eley und Cox (2003) beschrieben in einer Studie, welche sich mit der proteolytischen und hydrolytischen Aktivität von parodontopathogenen Keimen beschäftigt, neben der Cysteinproteaseaktivität auch eine Serin- und eine Metallproteaseaktivität von *P. intermedia*.

Auch wir konnten nach Inkubation mit dem entsprechenden Substrat beide Proteaseformen anhand ihrer proteolytischen Aktivität nachweisen.

Zum Nachweis der Serinproteaseaktivität diente uns FTC Casein als Substrat.

Serinproteasen sind eine Untergruppe der Peptidasen. Ihr Hauptcharakteristikum ist die katalytische Triade, eine spezielle Anordnung von drei Aminosäuren (Aspartat, Histidin und Serin), die das aktive Zentrum dieses Enzyms kennzeichnet.

Besonders auffällig in diesem Versuch war die Tatsache, dass hier sowohl Aktivität im bakteriellen Sediment, als auch im Überstand gemessen werden konnte.

Metallproteasen gehören zu einer Gruppe von Proteasen, die unter Wasserverbrauch (Hydrolyse) Proteine spalten. Das Wassermolekül wird hierbei von Metallkationen in Position gehalten, welche an den Aminosäuren-Seitenresten des Enzyms gebunden sind.

Die im Versuch dargestellte Metallproteasenaktivität beschränkt sich auf eines der fünf klinischen Isolate. Bei Stamm M13 konnte eine relativ hohe proteolytische Aktivität nach Inkubation mit dem Substrat DQ Gelatin nachgewiesen werden, wobei sich diese auch hier lediglich im bakteriellen Sediment zeigte. Dem-

entsprechend können wir davon ausgehen, dass es sich hierbei um eine mit der Bakterienzellwand assoziierte Proteolyse handelt.

Isoliert betrachtet hat dieses Ergebnis relativ wenig Aussagekraft. Vergleicht man es jedoch mit den Diagrammen aus den Versuchen mit den Substraten Boc-Val-Leu-Lys-AMC und FTC-Casein so wird deutlich, dass dieser Stamm M13 ebenfalls eine hohe bakterienzellassozierte Serinproteasenaktivität aufweist, jedoch eine nur verschwindend geringe cysteinspezifische Aktivität. Es könnte möglich sein, dass *P. intermedia* -Genotypen mit starker Serin- und Metallproteasenaktivität eine nur geringe Ausprägung an Cysteinproteasen aufweisen.

Es lässt sich also darstellen, dass einzelne Stämme innerhalb einer Gattung unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen, was auch zu differenter proteolytischer Aktivität unterschiedlich starker Ausprägung führt.

7. Schlussfolgerung

P. intermedia besitzt eine hohe Prävalenz in subgingivalen Plaqueproben bei klinisch an Parodontitis erkrankten Probanden. Die Proteasegene für Interpain A, Interpain B und Interpain C waren in beiden Hauptformen der Parodontitis nachweisbar.

Die Prävalenz von *P. intermedia* scheint mit entsprechend tiefen Taschen assoziiert zu sein.

Es gibt keine Spezifität einer bestimmten Protease auf ein klinisches Krankheitsbild, dennoch findet sich ein tendenziell höheres Vorkommen von Interpain C bei Patienten mit chronischer Parodontitis.

P. intermedia besitzt eine hohe proteolytische Aktivität. Diese Aktivität ist mit Bakterienzellbestandteilen verbunden und wird nicht freigesetzt. Die Bakterienart besitzt eine cysteinspezifische amidolytische Aktivität (Interpain). Diese Aktivität stellt aber nur einen geringen Anteil der gesamten proteolytischen Aktivität dar.

P. intermedia besitzt neben *P. gingivalis*, *T. forsythia* und anderen oralpathogenen Keimen große Bedeutung als parodontopathogene Spezies. Die Proteasen, darunter die Interpaine, stellen wichtige Virulenzfaktoren dieser Spezies dar.

Weiteren Studien wird es vorbehalten sein, die Kenntnisse über die Funktion und Bedeutung der Proteasen in Verbindung mit der Pathogenese der klinischen Ausprägungsform der Parodontitis zu vertiefen.

Literaturverzeichnis

- Aduse-Opoku J, Muir J, Slaney J M, Rangarajan M, Curtis M A. 1995
Characterization, genetic analysis, and expression of a protease antigen
(PrpRI) of *Porphyromonas gingivalis* W50
Infect Immun 63, 4744-4754
- Armitage G C. 1999
Development of a Classification System for Periodontal Diseases and
Conditions
Ann Periodontol 4 (1)
- Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. 1995
Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens
in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions.
Oral Microbiology and Immunology 11, 266–27
- Asikainen S, Chen C. 1999
Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus*
actinomycetemcomitans and *Porphyromonas gingivalis*
Periodontology 2000 10, 65-81
- Braham P H, Monclab J. 1992
Rapid presumptive identification and further characterization of
Bacteroides forsythus
J Clin Microbiol 30, 649-654
- Brook I, Frazier E H. 2003
Immune Response to *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia*
in the Sputum of Patients With Acute Exacerbation of Chronic Bronchitis
CHEST 124, 832-833
- Brook I. 2002
Anaerobic bacteria in upper respiratory tract and other head and neck
infections
Ann Otol Laryngol 111, 430-440
- Cortelli J R, Roman-Torres C V G, Aquino D R, Franco G C N, Costa F O,
Cortelli S C. 2010
Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Brazilians with
chronic periodontitis
Braz Oral Res 24, 217-223
- Daep C A, Lamont R J, Demuth D R. 2008
Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with Oral Streptococci Requires
a Motif That Resembles the Eukaryotic Nuclear Receptor Box Protein-
Protein Interaction Domain
Infect and Immun 76, 3273-3280

- Dannewitz B, Eickholz P. Sep 2004
Fallbeschreibung: Generalisierte aggressive Parodontitis mit Zahnbehandlungsphobie
URL http://www.zm-online.de/m5a.htm?/zm/17_04/pages2/zmed3.htm
- Darveau R P, Tanner A, Page R C. 1997
The microbial challenge in periodontitis
Periodontol 2000 14, 12-32
- Deutsche Gesellschaft für Parodontologie e.V. (DGP) 2010
Parodontitis 2010: Das Risikokompendium
Quintessenz Verlag, 31-49
- Dorn B R, Leung K-P, Progulske-Fox A. 1998
Invasion of Human Epithelial Cells by *Prevotella intermedia*
Infect and Immun 66, 6054-6057
- Eick S, Pfister W. 2002
Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples
J Clin Periodontol 29, 638–644
- Eley B M, Cox C W. 2003
Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defenses and tissues and detection in gingival crevice fluid
Periodontology 2000 31, 105-124
- Ezzo P J, Cutler C W. 2003
Microorganisms as risk indicators for periodontal disease.
Periodontology 2000 32, 24-35
- Fenno J, McBride, B C 1996
Virulence factors of oral treponemes
Anaerobe 4, 1-17
- Fukui K, Kato N, Kato H, Watanabe K, Tatematsu N. 1999
Incidence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* Carriage among Family Members with Subclinical Periodontal Disease
Journ of Clin Microbiol 37, 3141-3145
- Gängler P, Arnold W H. 2005
Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie. Zweite Auflage
Georg Thieme Verlag

- Gaetti-Jardim Jr E, Marcelino S L, Feitosa A C R, Romito G A, Avila-Campos M J. 2009
Quantitative detection of periodontopathic bacteria in atherosclerotic plaques from coronary arteries
Journ of Med Microbiol 58, 1568–1575
- Gazi M I, Cox S W, Clark D T, Eley B M. 1997
Characterisation of protease activities in *Capnophaga* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella* spp., *Treponema denticola* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*
Oral Microbiol Immunologie 12: 240-248
- Gomes BP, Pinheiro E T, Gadê-Neto C R, Sousa E L, Ferraz C C, Zaia A A, Teixeira F B, Souza-Filho F J. 2004
Microbiological examination of infected dental root canals
Oral Microbiol Immunol 19, 71-76
- Grenier D. 1996
Antagonistic effect of oral bacteria towards *Treponema denticola*
J Clin Microbiol 34, 1249-1252
- Griffen A L, Lyons S R, Becker M R, Moeschberger M L, Leyes E J. 1999
Porphyromonas gingivalis strain variability and periodontitis
J Clin Microbiol 37, 4028-4033
- Grundmann E, Roessner A, Pfeifer U, Müller-Hermelink H K. 2004
Pathologie für Zahnmediziner. Erste Auflage
Urban & Fischer, München, Jena, 147-158
- Gursoy U K, Könönen E, Uitto V-J. 2009
Prevotella intermedia ATCC 25611 targets host cell lamellipodia in epithelial cell adhesion and invasion
Oral Microbiol and Immunol 24, 304-309
- Haffajee A D, Socransky S S, Lindhe J, Kent R L, Okamoto H, Yoneyama T. 1991
Clinical risk indicators for periodontal attachment loss.
J Clin Periodontol 18, 117-125
- Haffajee AD, Socransky SS. 1994
Microbial etiological agents of destructive periodontal disease
Periodontology 2000 5, 78-111
- Hamlet S M, Cullinan M P, Westerman B, Lindeman M, Bird P S, Palmer J, Seymour G J. 2001
Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in an Australian population
J Clin Periodontol 28, 1163–1171

- Heidemann, D. 2005
Parodontologie. Vierte Auflage
Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München
- Hellwig E, Klimek J, Attin T. 2009
Einführung in die Zahnerhaltung. Fünfte Auflage
Deutscher Zahnärzteverlag, Köln, 480-482
- Heskens Y, van der Velden U, Veerman E, Nieuw Amerongen A V. 1992
Protein, albumin and cystatin concentrations in saliva of healthy subjects
and of patients with gingivitis or periodontitis
Journ of Periodontol 28, 43-48
- Huang Y, Umeda M, Takeuchi Y, Ishizuka M, Yano-Higuchi K, Ishikawa I. 2003
Distribution of Bacteroides forsythus genotypes in a Japanese
periodontitis population
Oral Microbiol Immunol 18, 208-214
- Imura T, Pike R N, Potempa J, Travis J. 1994
Pathogenesis of Periodontitis: A Major Arginase-specific Cysteine
Proteinase from Porphyromonas gingivalis Induces Vascular
Permeability Enhancement through Activation of the Kallikrein/Kinin
Pathway
Journ of Clin Invest 94, 361-367
- Institut der Deutschen Zahnärzte (IDZ). November 2006
Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). Kurzfassung
- Ishihara K. 2010
Virulence factors of Treponema denticola
Periodontol 2000 54, 117-135
- Ismail A, Lewis D W. 1993
Periodic health examination, 1993 update: 3. Periodontal diseases:
classification, diagnosis, risk factors and prevention
Can Med Assoc J 149 (10), 1409-1422
- Jansen H-J, Grenier D, Van der Hoeven J S. 1995
Characterisation of immunoglobulin G-degrading proteases of Prevotella
intermedia and Prevotella nigrescens
Oral Microbiol Immunol 10, 138-145
- Kilian M, Frandsen E V, Haubek D, Poulsen K. 2006
The etiology of periodontal disease revisited by population genetic
analysis. Periodontol 2000 42, 158-179
- Kohal R J , Dennison D K. 2000
Neue Paradigmen in der Pathogenese parodontaler Erkrankungen.
Dtsch Zahnärztl Zeitschrift 55, 660-666

- Kolenbrander P E, Parrish K D, Andersen R N, Greenberg E P. 1995
Intergeneric Coaggregation of Oral Treponema spp. With Fusobacterium
spp. and Intrgeneric Coaggregation among Fusobacterium spp.
Infect an Immun 63, 4584-4588
- Labbé S, Grenier D. 1995
Characterization of the human immunoglobulin G Fc-binding activity in
Prevotella intermedia
Infect and Immun 63, 2785-2789
- Love R. 2004
Invasion of dental tubules by root canal bacteria
Endodontic Topics 9, 52-65
- Mäkelä M, Salo T, Uitto V-J, Larjava H. 1994
Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular
origin and relationship to periodontal status
Journ of Dent Res 73, 1397-1406
- Mallorqui-Fernandez N, Manandhar S P, Mallorqui-Fernandez G, Uson I,
Wawrzonek K, Kantyka T, Sola M, Thogersen I B, Enghild J J, Potempa
J, Gomis-Rüth F X. 2008
A New Autocatalytic Activation Mechanism for Cyseine Proteases
Revealed by Prevootella intermedia Interpain A
The Journ of Biol Chemist 283, 2871-2882
- Marsh P, Martin M V. 2003
Orale Mikrobiologie: deutsche Übersetzung der vierten Originalauflage
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 45-50
- Matsushita K, Nagakoga S, Arakaki R, Kawabata Y, Iki K, Kawagoe M, Takada
H. 1994
Immunobiological activities of a 55-kilodalton cell surface protein of
Prevotella intermedia ATCC 25611
Infect Immun 62, 2459-2469
- McAlister A D, Sroka A, Fitzpatrick R E, Quinsey N S, Travis J, Potempa J, Pike
R N. 2009
Gingipain enzymes from Porphyromonas gingivalis preferentially bind
immobilized extracellular proteins: a mechanism
favouring colonization?
J Periodontal Res 44, 348-353
- Moen K, Brun J G, Madland T M, Tynning T, Jonsson R. Nov 2003
Immunglobulin G an A Antibody Responses to Bacteroides forsythus and
Prevotella intermedia in Sera an Synovial Fluids of Arthritis Patients
Clin Diagn Lab Immunol 10, 1043-1050

- Moore W E, Moore L V. 1994
The bacteria of periodontal diseases
Periodontology 2000 10, 66-77
- MSD Sharp & Dohme GmbH 2007
Das MSD Manual der Diagnostik und Therapie [Gebundene Ausgabe].
Siebte Auflage
Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 1037-1039
- Offenbacher, S. 1996
Periodontal diseases: pathogenesis
Ann Periodontol 1, 821-878
- Okada M, Hayashi F, Nagasaka N 2001
PCR detection of 5 putative periodontal pathogens in dental plaque
samples from children 2 to 12 years of age
J Clin Periodontol 28, 576–582
- Owen C A, Campbell E J. 1999
The cell biology of leucocyte-mediated proteolysis
Journ fo Leuko Biol 56, 137-150
- Paju S, Carlson P, Jousimies-Somer H, Asikainen S. 2000
Heterogeneity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in
various human infections and relationships between serotype, genotype
and antimicrobial susceptibility
J Clin Microbiol 38, 79-84
- Pfau E A, Avilla- Campos M J. 2005
Prevotella intermedia and *Porphyromonas gingivalis* isolated from
osseointegrated dental implants: colonization and antimicrobial
susceptibility
Braz J Microbiol 36, 281-285
- Potempa M, Potempa J, Kantyka T, Nguyen K-A, Wawrzonek K, Manandhar S
P, Popadiak K, Riesbeck K, Eick S, Blom A M. 2009
Interpain A, a Cysteine Proteinase from *Prevotella intermedia*, Inhibits
Complement by Degrading Complement Factor C3
PloS Pathogenes 5, 1-14, URL
<http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000316>
- Psoter W J, Ge Y, Russell S L, Chen Z, Katz R V, Jean-Charles G, Li Y. 2010
PCR detection of *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter
actinomycetemcomitans* in dental plaque samples from Haitian
adolescents
Clin Oral Invest

- Sahm A. 2005
Qualitative und quantitative Analyse von parodontopathogenen Mikroorganismen bei Patienten mit koronaren Herzkrankheiten
Inaugural-Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
- Saito A, Inagaki S, Ishihara K. 2009
Differential ability of periodontopathic bacteria to modulate invasion of human gingival epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis*
Microbial Pathogenesis 47, 329–333
- Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. 2002
Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis*
Evol Microbiol 52, 841-849
- Schlagenhauf U. 2006
Parodontologie, Teil 1: Anatomie, Mikrobiologie, Immunsystem, Ätiologie, Epidemiologie
Begleitskript zur Hauptvorlesung, 49-98
- Shah H N, Collins D M. 1990
Prevotella, a New Genus To Include *Bacteroides melaninogenicus* and Related Species Formerly Classified in the Genus *Bacteroides*
Intern Journ of System Bacteriol 40, 205-208
- Slots J, Genco R J. 1984
Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction
J Dent Res 63, 412-421
- Socransky S S, Haffejee A D. 1991
Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment
J Periodontal Res 26, 195-212
- Socransky S S, Haffajee A D, Cugini M A, Smith C, Kent R L J. 1998
Microbial complexes in subgingival plaque
J Clin Periodontol 25, 134–144
- Sreenivasan P K, Meyer D H, Fives-Taylor P M. 1993
Requirements for invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*
Infect Immun 61, 1239-1245
- Takanashi K, Kishi M, Okuda K, Ishihara K. 2004
Colonization by *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* from teeth to osseointegrated implant regions
Bull Tokyo Det Coll 45, 77-85

- Tanaka S, Yoshida M, Murakami Y, Ogiwara T, Shoji M, Kobayashi S, Watanabe S, Machino M, Fujisawa S. 2008
The Relationship of *Prevotella intermedia*, *Prevotella negrescens* and *Prevotella melaninogenica* in the Supragingival Plaque of Children, Caries and Oral Malodor
Journ of Pediat Dent 32, 195-200
- Thaweboon B, Thaweboon S, Choonharuangdej S, Suppakpatana P. 2006
Effects of sonicated *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* and *Lactobacillus casei* extracts on Interleukin-8 Production by human dental pulp cells
Southeast Asian J Trop Med Public Health 37, 523-527
- Thomas D D. 1996
Aspects of adherence of oral spirochetes
Crit Rev Oral Biol Med 7, 4-11
- Uitto V-J, Overall C M, McCulloch C. 2003
Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid
Periodontology 2000 31, 77-104
- Van Winkelhoff A J, Loos B G, Van der Reijden W A, Van Der Velden U. 2002
Porphyromonas gingivalis, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction
J Clin Periodontol 29, 1023–1028
- Yanagisawa M, Kuriyama T, Williams D W, Nadagawa K, Karasawa T. 2006
Proteinase Activity of *Prevotella* Species Associated with Oral Purulent Infection
Curr Microbiol 52, 375-378
- Zabel L, Werner H. 1997
Gramnegative Anaerobier I – Genera *Bacteroides* und *Prevotella*
Journ of Laborat Med 50, 1-12

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Hermann, Stefan
Geburtsdatum	02.07.1985
Geburtsort	Sonneberg, Thüringen
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

09/1992 – 06/1996	Staatl. Grundschule Köppelsdorf
08/1996 – 06/2004	Heinrich-Heine-Gymnasium Sonneberg
2002	Externer Realschulabschluss
	Regelschule Bürgerschule Sonneberg
06/2004	Abitur

Hochschulausbildung

10/2004 – 01/2010	Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
12/2009	Zahnärztliche Prüfung / Staatsexamen
01/2010	Zahnärztliche Approbation
01/2010 – 05/2010	Assistenz Zahnarzt Praxis Thomas Steinbrückner
seit 06/2010	Assistenz Zahnarzt Praxis Dipl.-Stom. Karl-Uwe Mraß

Ort, Datum

Stefan Hermann

Danksagung

Ich danke Frau PD Dr. med. habil. Sigrun Eick für ihre umfassende fachliche Beratung und Betreuung bei der Erstellung der Dissertation, Herrn Prof. Dr. med. habil. Wolfgang Pfister und Frau PD Dr. med. habil. Sigrun Eick für die freundliche Unterstützung und die Vergabe des Promotionsthemas, Herrn Prof. Dr. med. habil. E. Straube, dem Direktor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, für die Erlaubnis, die Räumlichkeiten, Gerätschaften und Materialien im Institut für Medizinische Mikrobiologie regelmäßig nutzen zu dürfen, Herrn Prof. Ph.D., D.Sc. Jan Potempa, dem Leiter der Abteilung Mikrobiologie der Biochemischen, Biophysikalischen und Biotechnologischen Fakultät der Jagiellonian-Universität Krakau sowie den wissenschaftlichen Mitarbeitern, Doktoranden, Laboranten für die freundschaftliche Zusammenarbeit, Tomasz Kantyka für die vielen geduldigen Stunden im Labor und meiner Familie für den langjährigen Rückhalt.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. habil. Sigrun Eick und Prof. Dr. med. habil. Wolfgang Pfister
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Stefan Hermann, Verfasser